

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Matemática Aplicada  
(Biomatemática)



## TESIS DOCTORAL

**Efectos de la estimulación artificial de un nervio periférico seccionado  
sobre la vía somatosensorial desaferentizada de la rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Celia Herrera Rincón**

Directores

Fivos Panetsos Petrova  
Carlos Avendaño Trueba

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Matemática Aplicada (Biomatemática)**



**EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ARTIFICIAL  
DE UN NERVI PERIFÉRICO SECCIONADO  
SOBRE LA VÍA SOMATOSENSORIAL  
DESAFERENTIZADA DE LA RATA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

***Celia Herrera Rincón***

Bajo la dirección de los Doctores

Fivos Panetsos Petrova

Carlos Avendaño Trueba

Madrid, 2014

**Universidad Complutense de Madrid**

Facultad de Ciencias Biológicas



# **EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ARTIFICIAL DE UN NERVIO PERIFÉRICO SECCIONADO SOBRE LA VÍA SOMATOSENSORIAL DESAFERENTIZADA DE LA RATA**

Trabajo de Investigación que presenta

**Celia Herrera Rincón**

para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
de la Universidad Complutense de Madrid

Dirigido por los Doctores

**Fivos Panetsos Petrova**

Catedrático de la Sección Departamental de Matemática Aplicada  
(Biomatemática)

de la Facultad de Óptica y Optometría  
de la Universidad Complutense de Madrid

y

**Carlos Avendaño Trueba**

Catedrático del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia  
de la Facultad de Medicina  
de la Universidad Autónoma de Madrid





---

**Universidad Complutense de Madrid**

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Matemática Aplicada (Biomatemática)

Doctorado en Neurociencia

**EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ARTIFICIAL DE UN  
NERVIO PERIFÉRICO SECCIONADO SOBRE LA VÍA  
SOMATOSENSORIAL DESAFERENTIZADA DE LA  
RATA**

**VºBº de los Directores de la Tesis**

**Fdo. Prof. Fivos Panetsos Petrova**

**Fdo. Prof. Carlos Avendaño Trueba**

**Madrid,  
Abril de 2014**



*Natura abhorret vacuum*



# ÍNDICE

---



<b>ÍNDICE</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y VISIÓN GLOBAL DE LA TESIS	23
2. ANTECEDENTES	25
2.1. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE LA VÍA TRIGEMINAL DE LA RATA	25
2.1.1. Estructuras Periféricas	27
2.1.2. Complejo Sensorial del Trigémino (CST)	29
2.1.3. Complejo VentroPosterior Talámico	31
2.1.4. Corteza Somatosensorial Primaria	33
2.2. PLASTICIDAD CEREBRAL	36
2.2.1. Definición, Tipos y Mecanismos neurobiológicos implicados	36
2.2.2. Implicaciones y aplicaciones de la neuroplasticidad	43
2.3. DESAFERENTIZACIÓN Y PLASTICIDAD	45
2.3.1. Plasticidad en el sistema somatosensorial	45
2.3.2. Plasticidad central inducida por desafrentización en otros sistemas sensoriales	50
2.4. NEUROESTIMULACIÓN Y PLASTICIDAD	52
2.5. DESAFERENTIZACIÓN, NEUROPRÓTESIS Y PLASTICIDAD	53
2.5.1. Neuroprótesis Sensoriales Funcionales. Implantes Cocleares	54
2.5.2. Neuroprótesis en Amputación	56
<b>II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO</b>	<b>61</b>
1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
1.1. HIPÓTESIS	63
1.2. OBJETIVOS	63
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	64
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
1. MATERIALES	69
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	69
1.1.1. Grupos experimentales	69
1.1.2. Tamaño de la muestra	70
1.2. MATERIAL DE LABORATORIO HISTOLÓGICO	71
1.2.1. Reactivos generales. Tinciones e histoquímica	71
1.2.2. Anticuerpos empleados en Técnicas de Inmunomarcado	73
1.3. MATERIAL DE LABORATORIO ELECTROFISIOLÓGICO	74
1.3.1. Material para Registros Electrofisiológicos	74
1.3.2. Material para Estimulador Neuroprotésico	75
2. MÉTODOS	77
2.1. DESARROLLO DEL ESTIMULADOR NEUROPROTÉSICO	77
2.2. CIRUGÍA E IMPLANTES	79
2.3. ESTIMULACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES	82
2.4. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	83
2.5. SACRIFICIO, OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE TEJIDOS	85
2.6. TÉCNICAS DE TINCIÓN	87
2.6.1. Técnicas histológicas clásicas	87
2.6.2. Técnicas histoquímicas. Citocromo oxidasa - CyO	89
2.6.3. Técnicas de Inmunomarcado	89
2.7. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS	91
2.7.1. Análisis morfométricos 3D. Técnicas estereológicas	92
2.7.2. Análisis morfométricos 2D	96
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	97
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>99</b>
1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA (PMBSF)	101
1.1. ACTIVIDAD METABÓLICA: INTENSIDAD DE REACCIÓN CyO	101
1.2. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN CORTICAL	104
1.3. CIRCUITOS INHIBITORIOS. POBLACIONES DE INTERNEURONAS GABA-ÉRGICAS	108



1.3.1. Cuantificación de interneuronas PV-positivas .....	108
1.3.2. Cuantificación de interneuronas CB-positivas .....	110
1.4. INERVACIÓN COLINÉRGICA. INTENSIDAD DE NEUROPILO CHAT-POSITIVO .....	117
1.5. ACTIVIDAD FUNCIONAL. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	121
<b>2. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LAS ESTRUCTURAS TRIGEMINALES SUBCORTICALES .....</b>	<b>126</b>
2.1. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN DE VPM .....	126
2.2. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN DE Pr5 .....	127
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>133</b>
<b>1. CONSIDERACIONES CIENTÍFICO-TÉCNICAS .....</b>	<b>135</b>
1.1. MODELO EXPERIMENTAL .....	135
1.2. ELECCIÓN DE PARÁMETROS DE ESTUDIO .....	138
1.3. ELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES Y FUNCIONALES .....	140
1.4. LIMITACIONES TÉCNICAS .....	142
1.4.1. Estudio morfológico. Estimaciones cuantitativas .....	142
1.4.2. Estudio funcional. Registros electrofisiológicos .....	145
<b>2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>147</b>
2.1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LA CORTEZA DE BARRILES DESAFERENTIZADA .....	151
2.1.1. Actividad metabólica y organización estructural .....	151
2.1.2. Circuitos inhibitorios. Interneuronas corticales .....	154
2.1.3. Inervación colinérgica .....	156
2.1.4. Mantenimiento de la actividad funcional .....	157
2.2. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN SOBRE ESTRUCTURAS SUBCORTICALES DESAFERENTIZADAS .....	159
<b>3. DIRECCIONES FUTURAS .....</b>	<b>163</b>
3.1. ESTUDIOS A LARGO PLAZO Y CON RETRASO EN EL INICIO DE LA ES .....	163
3.2. ESTUDIOS DE LAS ESTRUCTURAS PERIFÉRICAS. TG Y NEUROMA .....	164
3.3. IMPLICACIONES DEL SISTEMA COLINÉRGICO .....	165
<b>4. POSIBLES IMPLICACIONES DE NUESTRO ESTUDIO .....</b>	<b>167</b>
4.1. APLICABILIDAD EN OTRAS PATOLOGÍAS. NEURORREPARACIÓN .....	167
4.2. IMPLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE BMIs AVANZADAS .....	167
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>173</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>187</b>
<b>1. ARTÍCULOS PUBLICADOS .....</b>	<b>189</b>
1.1. <b>Herrera-Rincon, C., Toret, C., Sanchez-Jimenez, A., Avendaño, C., Guillen, P., Panetsos, F.</b> 2010. Structural preservation of deafferented cortex induced by electrical stimulation of a sensory peripheral nerve. <i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.</i> 2010, 5066-5069. ....	189
1.2. Gonzalez Andino, S.L., <b>Herrera-Rincon, C., Panetsos, F., Grave de Peralta, R.</b> 2011. Combining BMI Stimulation and Mathematical Modeling for Acute Stroke Recovery and Neural Repair. <i>Front Neurosci.</i> 5, 87. ....	189
1.3. <b>Herrera-Rincon, C., Toret, C., Sanchez-Jimenez, A., Avendaño, C., Panetsos, F.</b> 2012. Chronic electrical stimulation of transected peripheral nerves preserves anatomy and function in the primary somatosensory cortex. <i>Eur J Neurosci.</i> 36, 3679-3690. ....	189

# **ABREVIATURAS**

---



A: grupo experimental Amputación o Amputado  
Ab: anticuerpo  
ABC: complejo avidina-biotina (por sus siglas en inglés, *Avidin Biotin Complex*)  
ACh: acetilcolina  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
Ag: antígeno  
AI: corteza auditiva primaria  
ALBSF: subcampo de *barriles* anterolateral (por sus siglas en inglés, *AnteroLateral Barrel SubField*)  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato  
ANOVA: análisis de la varianza  
ARN: ácido ribonucleico  
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro (por sus siglas en inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)  
BMI: Interfaces Cerebro-Máquina (por sus siglas en inglés, *Brain Machine Interfaces*)  
BSA: albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés, *Bovine Serum Albumin*)  
C: grupo experimental Control  
CaBPs: proteínas ligantes de calcio (por su siglas en inglés, *Calcium Binding Proteins*)  
CAMKII: proteína quinasa Calcio-Calmodulina tipo II  
Capa IIIs: capa cortical III superficial  
Capa IIIp: capa cortical III profunda  
CB: Calbindina-D28k  
ChAT: enzima colina acetil-transferasa  
CE: coeficiente de error  
*cl*: contralateral  
cm: centímetros  
CREB: elemento de respuesta del AMPc, factor de transcripción  
CST: complejo sensorial del trigémino, en tronco  
CyO: citocromo oxidasa  
Cx: corteza  
DAB: 3-3' diaminobencidina  
DM: privación monocular  
DO: densidad óptica

EEG: registro de actividad cortical, electroencefalograma

Eq.: ecuación

ES: estimulación eléctrica

FDA: Administración de los Estados Unidos para los Alimentos y los Fármacos (por sus siglas en inglés, *U S Food and Drug Administration*)

Fig.: Figura

fMRI: imagen por resonancia magnética funcional

g: gramo/s

GABA: ácido gamma amino butírico

GAD: enzima ácido glutámico descarboxilasa (por sus siglas en inglés, *Glutamic Acid Decarboxylase*)

GAP 43: proteína asociada al crecimiento 43 (por sus siglas en inglés, *Growth Associated Protein 43*)

GluRs: receptores ionotrópicos de glutamato

h: hora/s

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>: agua destilada

Hz: hercios

IC: implante coclear

i.d.: diámetro interno (por su siglas en inglés, *inner diameter*)

IHQ: inmunohistoquímica

*il*: ipsilateral

i.m.: intramuscular

IN: interneurona/s

IoN: nervio infraorbitario

i.p.: intraperitoneal

kg: kilogramo

lat: latencia

LSD: diferencia mínima significativa (por sus siglas en inglés, *Least Significant Difference*)

LTD: depresión a largo plazo (por sus siglas en inglés, *Long-Term Depression*)

LTP: potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés, *Long-Term Potentiation*)

m: metros

mg: miligramo/s

mGluRs: receptores metabotrópicos de glutamato

min.: minuto/s

mA: miliamperios

mL: mililitros

mm: milímetros

ms: milisegundos

mV: milivoltios

μA: microamperios

μL: microlitros

μm: micrómetros o micras

μs: microsegundos

NBM: núcleo basal magnocelular

NMDA: *N*-metil-D-aspartato

NRF-1: factor respiratorio nuclear tipo 1 (por sus siglas en inglés, *Nuclear Respiratory Factor 1*)

Obj.: Objetivo

o.d.: diámetro externo (por su siglas en inglés *outer diameter*)

P: día postnatal

PAF: paraformaldehído

PB: tampón fosfato

PEs: potenciales evocados

PLP: dolor por miembro fantasma (por sus siglas en inglés, *Phantom Limb Pain*)

PMBSF: subcampo de *barriles* posteromedial (por sus siglas en inglés, *PosteroMedial Barrel SubField*)

POm: núcleo posterior del tálamo, porción dorsomedial

Pr5: núcleo principal del trigémino, en tronco

PV: Parvalbúmina

Pyr: neuronas piramidales

RT: núcleo reticular talámico

S: grupo experimental Estimulación o Estimulado

s: segundo/s

s.c.: subcutáneo

SEM: error estándar de la media (por sus siglas en inglés, *Standard Error of the Mean*)

CGS: células del ganglio espiral

SmI: corteza somatosensorial primaria

SmII: corteza somatosensorial secundaria

SN: Sistema Nervioso

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

Sp5: núcleo espinal del trigémino, en tronco

Sp5c: subdivisión caudal del núcleo espinal del trigémino

Sp5o: subdivisión interpolar del núcleo espinal del trigémino

Sp5o: subdivisión oral del núcleo espinal del trigémino

T: separación media de los planos de corte

T<sup>a</sup> amb: temperatura ambiente

TC: tálamocortical

TG: ganglio trigémino

t/n: toda la noche

trk: tropomiosina-receptor-quinasa (por sus siglas en inglés, *tropomyosin-receptor-kinase*)

Tx: Triton X-100

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UE: Unión Europea

V: voltios

VI: corteza visual primaria

VIP: péptido intestinal vasoactivo (por sus siglas en inglés, *Vasoactive Intestinal Peptide*)

Vn: V par craneal o nervio trigémino

VPL: núcleo ventral posterolateral, en tálamo

VPM: núcleo ventral posteromedial, en tálamo

# SUMMARY

---





## SUMMARY

---

### INTRODUCTION

As early as the 1970s it has been known that sensory deafferentation provokes changes in the somatotopic maps at any relay station of the somatosensory pathway (Kaas, 1991). Functional changes were first observed in the dorsal column nuclei (Dostrovsky et al., 1976; Millar et al., 1976) and then were extensively documented in the somatosensory cortex of denervated animals (Kalaska and Pomeranz, 1979; Merzenich et al., 1983; etc.). Severe peripheral nerve injuries, such as those resulting from nerve trauma or limb amputation, give rise to substantial reorganization and plasticity phenomena in the central nervous system. Following sensory nerve damage, trans-synaptic effects are observed in the spinal cord (Wall et al., 1981), brainstem (Florence and Kaas, 1995; Negredo et al., 2009), thalamus (Garraghty and Kaas., 1991) and cortex (Merzenich et al., 1983a; Machin et al., 2006). Sensory input dependent alterations consist of shrinking of active regions, loss of neurons, and structural and functional reorganization of synapses, dendrites and circuits (Florence and Kaas, 1995; Buonomano and Merzenich, 1998; Jain et al., 1998; Wall et al., 2002; Kaas & Collins, 2003; for reviews, see Feldman and Brecht, 2005; Holtmaat and Svoboda, 2009; Mountcastle, 2005). The interruption of sensory input leads to a fast contraction of the deprived cortical areas and a subsequent slow expansion of the adjacent intact cortical areas (Feldman and Brecht, 2005). Long-term manipulation of the peripheral nerves decreases the metabolic activity of neurons (Skibinska et al., 2000; Panetsos et al., 2008), which is directly related to their functional activity (Kis et al., 1999; for review, see Wong-Riley, 1989). Likewise, sensory deprivation due to cochlear lesions provokes a cascade of pathological and atrophic events from the sensory organ to the auditory mesencephalic nuclei (Terayama et al., 1977; Pasic et al., 1994; Shepherd and Hardie, 2001) and these subcortical alterations lead to an anomalous tonotopic organization of the auditory cortex and loss of processing capabilities (Bao et al., 2004). In the visual system, monocular lid suture or enucleation, or intraocular tetrodotoxin injection results in a marked reduction of the neural activity in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of cats and primates (Wong-Riley and Carroll, 1984). Cortical inhibitory circuits are strongly involved in such input-dependent alterations and plasticity phenomena. Peripheral deafferentation provokes an immediate decrease of activity in the inhibitory

circuits and the expression of subthreshold inputs, with a time course and duration depending on the type of deafferentation and age of the subject (Welker et al., 1989; Cellerino et al., 1992; Blumcke et al., 1994; Skangiel-Kramska et al., 1994; Carder et al., 1996; Calford, 2002; Tropea et al., 2006; Panetsos et al., 2008; Desgent et al., 2010). Given the well-proven GABAergic nature of all parvalbumin (PV)-positive and a vast majority of calbindin-D28k (CB)-positive nonpyramidal cortical neurons (Kubota et al., 1994; Gonchar and Burkhalter, 1997), changes in the expression of these calcium-binding proteins are valid indicators of the functional state of inhibitory networks.

On the basis of the well-proven dependence on the incoming activity of the neural organization and function of the cortex, we hypothesise that therapeutically oriented manipulations of the peripheral input, such as artificial electrical stimulation or implant of sensory neuroprostheses, could be used to protect, preserve or even recover the functionality and structure organization of the nervous tissue (e.g. in the case of amputation). However, very few studies are available to assess the impact of artificial electrical stimulation on the central nervous system (Di Pino et al., 2009) and almost all of them are centered on the auditory system (Fallon et al., 2008).

## EXPERIMENTAL DESIGN, MATERIALS AND METHODS

In this study, we aimed at investigating the neuroprotective and preservative effect of artificial sensory input to the somatosensory cortex (Sml) of sensory deafferented rats. To prove it, we design an experimental model of amputation and subsequent neuroprosthetic stimulation in rat trigeminal system, specifically in the vibrissae-barrels pathway.

We centered our study on the posteromedial barrel subfield (PMBSF), the barrel subregion where the largest whiskers are represented. We chose the tactile trigeminal system of the rat due to its highly topographic organization and the broad knowledge that has been gathered on its anatomy, physiology, plasticity and behavior over the last few decades (Waite and Tracey, 1995; Diamond et al., 2008; Sanchez-Jimenez et al., 2009; Panetsos and Sanchez-Jimenez, 2010). The main sensors of this system are hairs located in the snout of the animal, including a matrix of 33 long hairs (macrovibrissae or main whiskers) with which the rat actively touches and perceives external objects. Tactile information is conveyed to the central nervous system through the largest component (infraorbital nerve, IoN) of the second branch (maxillary branch) of the trigeminal nerve in a spatially organised manner. Along the trigeminal pathway, groups

of neurons are spatially organised in patterns resembling those of the whiskers in the snout (somatotopic maps), each group being mainly devoted to the processing of tactile information from a single whisker (Land et al., 1995). In cortical layer IV, these anatomical and functional groups of neurons take the shape of ‘barrels’, forming a cortical ‘barrel field’ (Woolsey et al., 1975), which represents the vibrissae from the contralateral side. Thus, the effect of a unilateral experimental manipulation can be assessed by comparing a number of electrophysiological and histochemical parameters in the contralateral (affected) and ipsilateral (control) cortex.

The IoN was completely and irreversibly sectioned (amputated animals-A) and connected to a home-made stimulator device (stimulated animals-S). The artificial stimulation was continuously applied to the proximal stump of the severed nerve for 28 days. After this period, we performed anatomical and electrophysiological comparative analysis of somatosensory cortex of A, S and control (C) animals (without experimental manipulation), by quantitative measurements of metabolic activity, volume of neuropil, inhibitory circuits (populations of parvalbumin-PV- and calbindin D28k-CB- positive interneurons), cholinergic innervation and functional activity. Furthermore, the volume of other subcortical structures of the afferent pathway, as main trigeminal nucleus (Pr5) in brainstem, and ventral posteromedial nucleus (VPM) in thalamus, were evaluated to determine possible involvement for events detected in cortex. Intergroup and side-to-side comparisons of anatomical and electrophysiological parameters were performed in A-, S-, and C- animals.

Parameters for histology, stereology and electrophysiological recordings were chosen for their well-proved features: cortical somatosensory evoked potentials (EPs) for SmI functionality; expression of cytochrome oxidase (CyO; a critical enzyme of the mitochondrial respiratory chain and a good marker of long-term neuronal metabolic activity; Wong-Riley, 1989; Bruchey and Gonzalez- Lima, 2008) in order to assess the metabolic activity of the barrel cortex; volume of cortical layers to evaluate preservation of gross anatomical features; number of PV- and CB-positive neurons (inhibitory GABAergic interneurons) in the SmI to evaluate the electrical stimulation dependent cortical plasticity as most deafferentation- related plasticity phenomena are mediated by disinhibition processes (Calford, 2002; Jiao et al., 2006) and cholinergic innervation due to the peripheral deafferentation down-regulates acetylcholine synthesis in sensory cortices (Avendaño et al., 1995).

## RESULTS AND DISCUSSION

The main goal of the present study was to assess the neuroprotective and preservative effect of artificial sensory input to the SmI in sensory deafferented animals. By inferring the metabolic activity through the expression of CyO, we investigated which cortical regions were protected and how, and we then quantified such effects in a reliable manner. Whereas peripheral deafferentation severely affected the metabolic activity of SmI granular and supragranular layers with a significant drop of intensity (up to -10%) and volume of the active tissue (-3% in layers II/III and -15% in layer IV), artificial stimulation of the transected nerve impeded all these changes. Such notable changes did not occur when the IoN was chronically stimulated. In A animals, our results are in agreement with previous studies on peripheral deafferentation showing lower metabolic activity and up to 16% loss of the dimensions of the barrel cortex (Kossut, 1992; Machin et al., 2004; Panetsos et al., 2008; Mowery et al., 2009). In the case of electrical stimulation, the significant differences between A and S animals in both metabolic activity and cortical volume indicate that the sensory cortex corresponding to the stimulated nerve maintained its usual level of activity (layers IV and II/III receive a dense input from the periphery and dense intracortical projections; Hoeflinger et al., 1995; Chakrabarti and Alloway, 2006).

Amputation of peripheral nerve led to drastic consequences on cortical inhibitory interneurons, causing drops of up to -20% for PV-positive and 12% for CB-positive (significant in the supragranular layers). The artificial stimulation prevented these degenerative changes. Deafferentation-dependent plasticity is strongly dependent on disinhibition processes (Dykes et al., 1995; Jain et al., 1998). Peripheral deafferentation induces a rapid and variably lasting down-regulation of GABA or glutamic acid decarboxylase (GAD, the synthetic enzyme for GABA) expression in cortical interneurons (Warren et al., 1989; Welker et al., 1989; Rosier et al., 1995; Gierdalski et al., 1999) and long-lasting reductions in cortical interneurons expressing PV and/or CB after visual (Carder et al., 1996; Desgent et al., 2010), auditory (Desgent et al., 2010) and somatosensory (Panetsos et al., 2008; Nowicka et al., 2009) deafferentations. This occurs because neuronal activity strongly regulates their oxidative metabolism and neurotransmitter expression, which makes them particularly vulnerable to deafferentation and functional deprivation (Nie & Wong-Riley, 1996). Parvalbumin is expressed by two classes of cortical interneurons: large basket cells that receive direct thalamocortical input and activate the intrinsic inhibitory microcircuit, and chandelier

cells that synapse upon the initial segments of pyramidal cell axons and control the output of the cortical circuit. Both cell types are present in all cortical layers, but predominate in layers III–IV. CB is mainly expressed by bitufted and bipolar cells, which are mainly concentrated in layers II/III and V/VI (DeFelipe, 1997; Druga, 2009). Although the role of inhibitory interneurons in experience-dependent plasticity is unclear (Jiao et al., 2006; Nowicka et al., 2009; Sun, 2009), it has been shown that sensory deprivation strongly inhibits fast-spiking neurons, most of which are interneurons that express PV (Kawaguchi & Kubota, 1997), and weakens feed-forward inhibition from layer IV to layers II–III (Sun, 2009; House et al., 2011). This local disinhibition, which in a sensory-deprivation paradigm has been interpreted as a compensatory process to keep an appropriate excitatory–inhibitory balance in the deprived cortex (House et al., 2011), could also be assigned a homeostatic role to balance the presumed reduction of subcortical excitatory drive in the barrel cortex caused by permanent IoN transection. Our results using sustained artificial stimulation to the severed IoN fit neatly with this view; the presumably increased thalamocortical input accessing the barrel cortex is correspondingly balanced by the observed reduction in inhibitory circuits in animals of the S group.

By studying the density of cholinergic neuropil, we noted that both amputation and stimulation, there was a significant drop of about 20% in the immunolabeling for ChAT. That is, the cortical cholinergic activity was not affected by artificial peripheral stimulation. Loss of ACh in the deafferented cortices is in perfect agreement with classical observations on both, immediate and persistent ACh downregulation (Rothe et al. 1990; Avendano et al. 1995). Lack of ACh recovery in stimulated animals indicates that complex plasticity and learning mechanisms are involved in cholinergic depletion and artificial stimulation cannot modulate such processes. Decrease of the cholinergic innervation alongside layers II–III and IV supports this suggestion. Indeed the cholinergic neuropil has a laminar distribution through all cortical layers and, in addition to the thalamocortical input (Metherate and Ashe 1993), ACh synapses also contact with excitatory and inhibitory cortical interneurons and potentiate intracortically-dependent cortical responses (Sillito and Kemp 1983; Metherate and Weinberger 1989, 1990; Murphy and Sillito 1991). Xiang et al. (1998) suggest an inhibitory role for ACh in intracolumnar connections and a facilitatory role in intralaminar horizontal connections.

Whereas the EPs recorded in the barrel field of A animals differ significantly from those in C animals (35–40% longer latencies and 70% smaller areas), cortical potentials in S animals more resemble those recorded from C animals (displaying only 10–25% longer latencies and 30–40% smaller areas). The increased latency and lower amplitude of the N-wave in A animals could have originated from the reduced activity of layer I–III cortical neurons. In control animals, the N-wave is formed by two components that appear with a delay of 1.5–4.0 ms (Jackson & Cauller, 1998; Kublik et al., 2001). The first component is abolished by brief cooling pulses to the cortical surface, a phenomenon that the authors attributed to the activity of the supragranular pyramidal cells (Kublik et al., 2001). The chronic lack of peripheral input probably reduces the cortico-cortical input to these cells, lowering their excitability state and reducing their capacity for a fast response to the incoming stimuli, effects that are prevented by the chronic activation of the SI by the artificial stimulation of the nerve. Longer latencies in A animals could be due to a decreased GABAergic activity. It is well known that peripheral deafferentation produces a decrease in the number of c-aminobutyric acid (GABA)-immunoreactive neurons in both the thalamus and cortex (Dostrovsky et al., 1976; Land & Akhtar, 1987; Welker et al., 1989), whereas in S animals this effect is prevented by the electrical stimulation of the peripheral nerve that supplies the inhibitory cells with excitatory input. Our data are compatible with the recovery of neural activity observed in the inferior colliculus following an electrical stimulation of the interrupted auditory nerve (Chouard et al., 1983; Matsushima et al., 1991; Schwartz et al., 1993; Marasco & Kuiken, 2010). Rasmusson and colleagues (Turnbull & Rasmusson, 1991; Rasmusson et al., 1992) showed that the early stage of the reorganization process after peripheral deafferentation in the raccoon is dominated by inhibitory processes and an increase of the inhibitory responses to stimulation of adjacent skin. These mechanisms could be responsible for the reduced cortical responses observed in our animals. The maintenance of normal patterns of activity in the barrel cortex observed in stimulated animals could obey the same laws as the expansion of the spared barrels in the case of whisker trimming. Using this experimental paradigm, the barrels corresponding to the spared whiskers expand their activity to the neighboring barrels and such expansion can reach the entire barrel field, probably due to potentiation or sprouting of horizontal connections in layers II/III and/or IV (Maier et al., 2003).

In summary, our results show that chronic deafferentation provoked significant changes in cortical organization, with significant decreases in metabolic activity, volume, number of GABAergic interneurons and cortical cholinergic innervation, both in supragranular (II- III) and granular (IV) layers in barrel cortex. Evoked potentials also showed an increase in latency and a decrease in N-wave amplitude. The artificial nerve stimulation prevented deafferentation-dependent effects, preventing the drop in the metabolic activity, volume, inhibitory circuits and functional activity in deafferentated cortex. The decrease in cholinergic innervation, however, continued to be reduced after the application of the peripheral stimulation. Subcortical structures were also affected by peripheral manipulations, resulting in a decrease in volume in A-animals, which tended to normalization after stimulation.

## CONCLUSSION AND FUTURE DIRECTIONS

Together, our results provide evidence that chronic electrical stimulation has a neuroprotective effect and maintenance of the sensory cortex, suggesting the possibility that, by controlling the physical parameters of an artificial sensory input to a severed peripheral nerve, brain regions chronically deafferentated could remain at levels close to "normality", thus preventing, or at least lessening, the deleterious effects of deafferentation. Our findings may be important for the design of advanced brain-machine interfaces and therapeutic purposes in brain injury or degenerative neural processes. Alterations in the activity of inhibitory networks bring about rapid reorganization of receptive fields and representational maps (Calford, 2002). This remapping becomes more extensive and permanent after long-term deafferentations (e.g. amputations; Merzenich et al., 1983b; Pons et al., 1991) and is accompanied by structural changes in axons, dendrites, spines and synapses (Kossut, 1998; Hickmott & Steen, 2005; Machin et al., 2006). The preservation of relevant inhibitory networks observed in S animals suggests that the sustained artificial stimulation of the severed peripheral nerve acts upon the structural and functional bases of remapping. In the case of stroke, assuming that some circuits that convey sensory information to the brain have survived, sustained sensory input will trigger synapse- based plasticity mechanisms (homeostatic and hebbian plasticity) that help to create compensatory circuits (Murphy & Corbett, 2009; Gonzalez Andino et al., 2011). Future research should also address the effects of varying the stimulation parameters, long-term stimulation and neural stimulation starting with delays between nerve lesion and electrode implantation.





# **I. INTRODUCCIÓN**

---



## INTRODUCCIÓN

---

### **1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y VISIÓN GLOBAL DE LA TESIS**

El sistema nervioso (SN) es abierto y dinámico, y sólo alcanza su sentido funcional cuando interactúa bidireccionalmente con el entorno en el que se encuentra. Los órganos sensoriales periféricos reciben los estímulos (o información sensorial aferente) y son capaces de convertirlos en señales eléctricas, que se envían al cerebro a través de los nervios periféricos. En los centros superiores, la información es analizada e integrada para emitir una respuesta que permita la adaptación. El SN está “vivo” y necesita esta actividad aferente (capaz de desencadenar una respuesta) para mantenerse, modelarse y desarrollarse a lo largo de toda la vida.

Tras una amputación o tras sección completa de nervio periférico sensitivo se produce una disrupción permanente de la actividad aferente, con graves consecuencias para los pacientes que la sufren. Se estima que existen unos 400,000 amputados en la Unión Europea (UE), con una incidencia de 2/100,000 personas por año descritas para amputaciones del miembro superior. Este número, a diferencia de otras patologías, irá en aumento, por diferentes causas, tanto en los países desarrollados como en los más pobres. Del mismo modo, las lesiones nerviosas de la extremidad superior son comunes en todos los países, con una incidencia de unos 300,000 casos por año en la UE, suponiendo el 20% del total de las visitas a los servicios de urgencia. El impacto socioeconómico que suponen y la falta de herramientas terapéuticas eficientes evidencia la necesidad de investigación en este campo.

Una primera parte de esta Tesis Doctoral se centra en los mecanismos neurobiológicos que siguen a una sección completa e irreversible de nervio periférico sensitivo. De forma global, la falta de continuidad en el axón provoca que los estímulos no sean transmitidos y que, a corto plazo, toda la vía nerviosa aferente queda “silenciada”. La consecuencia primaria de este silenciamiento es la lógica pérdida de las funciones sensorimotoras asociadas a la vía. Esto es sólo a corto plazo, pues tras un período más o menos largo las estructuras centrales se reorganizarán, volviéndose sensibles a aferentes de otras regiones intactas, aunque sean más lejanas. Esta reorganización dependiente de la actividad aferente es lo que se conoce como

*plasticidad o remodelamiento cerebral. A priori* podría parecer que esta reorganización compensatoria es siempre positiva, pero en la mayoría de los casos lo que se produce tras amputación es una degeneración seguida por una reorganización patológica que, además de la pérdida sensorial, conlleva a graves alteraciones de la percepción o a la aparición del dolor neuropático.

La segunda parte de la Tesis, y su aportación más novedosa, investiga una de las herramientas actuales más esperanzadoras para los amputados y para las patologías neurológicas en general, las Interfaces Cerebro-Máquina (BMI de sus siglas en inglés, *Brain Machine Interfaces*) aferentes o neuroprótesis sensoriales, desde un punto de vista distinto al convencional. El fundamento de una BMI aferente o sensorial es aportar información sensorial al sistema nervioso a través de estimulación eléctrica. Nuestro interés no se ha focalizado en la propia interfaz dispositivo externo-sistema nervioso, o en la codificación de la información, sino en la “reacción” de un SN privado a la estimulación artificial o actividad entrante proveniente de un dispositivo externo. Concretamente, en este trabajo investigamos los eventos morfológicos y funcionales que ocurren en la corteza somatosensorial primaria (SmI) desaferentizada de rata tras aplicar estimulación eléctrica artificial al nervio periférico amputado. Mediante el empleo de técnicas morfológicas y electrofisiológicas, hemos estudiado las alteraciones en distintos parámetros relacionados con la plasticidad cortical como actividad metabólica, volumen tisular, circuitos inhibitorios, inervación colinérgica y actividad funcional o electrofisiológica. Otras estructuras subcorticales de la vía han sido también analizadas para determinar su influencia sobre los eventos detectados en corteza.

Fruto de la investigación que recoge la presente tesis, se han publicado tres artículos, incluidos al final de la misma, en IEEE (2010), *Frontiers in Neuroscience* (2011) y *European Journal of Neuroscience* (2012), respectivamente

## 2. ANTECEDENTES

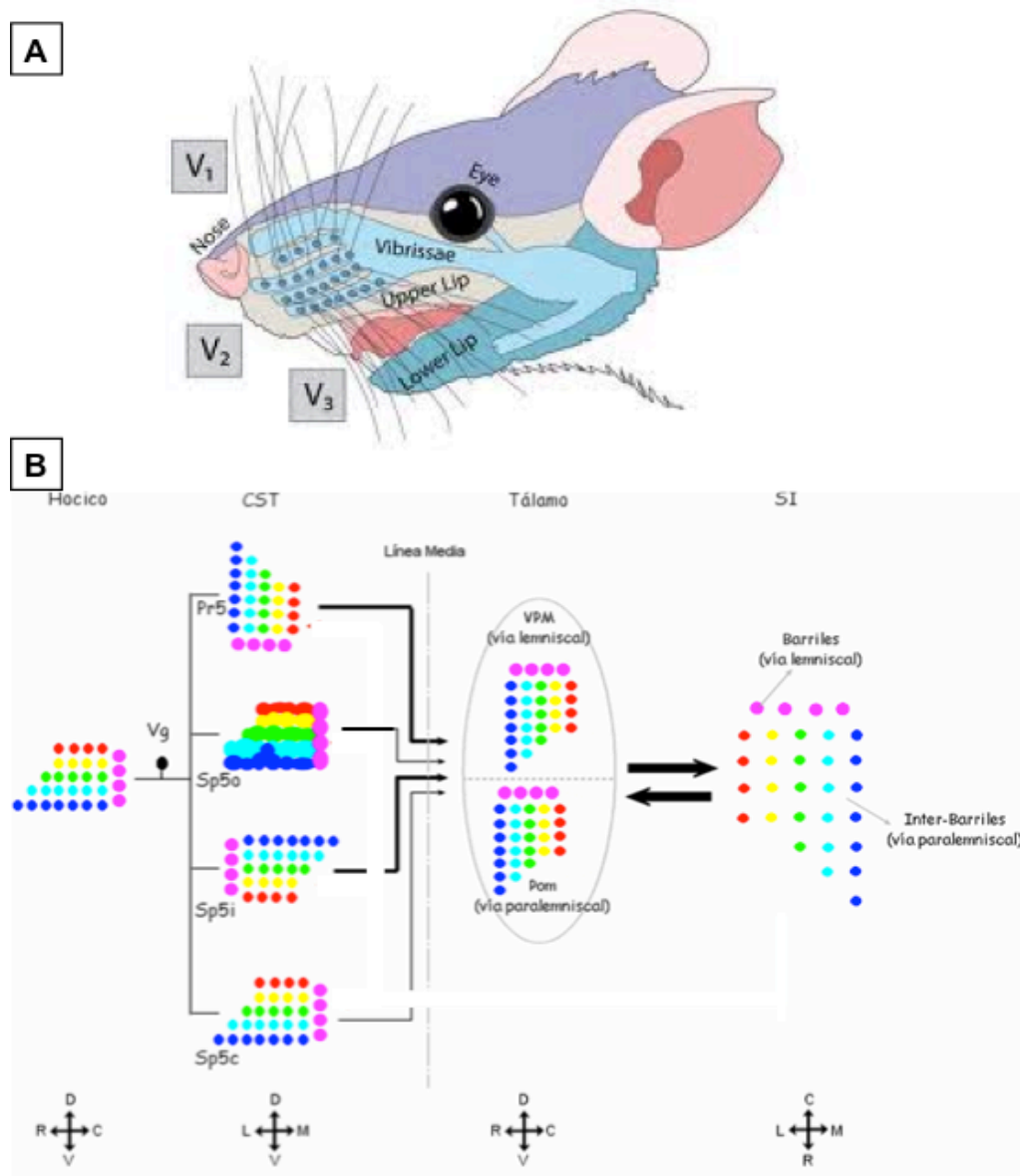
### 2.1. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE LA VÍA TRIGEMINAL DE LA RATA

El sistema trigeminal sensorial se encarga del procesamiento de la información somatosensorial (mecanocepción, propiocepción, termo/nocicepción) de la cabeza y cara de la rata. Dependiendo de su localización, los tejidos craneales están inervados por una de las tres ramas del nervio trigémino: la oftálmica (V1), maxilar (V2) o mandibular (V3). En la rata, la rama oftálmica inerva el dorso de la cabeza, párpado superior, vibrisas supraorbitarias, córnea y conjuntiva, piel desnuda y pilosa situada en el dorso, punta de nariz y la mucosa intranasal. La división maxilar inerva la piel postorbitaria, labio superior, almohadilla de vibrisas y nariz lateral, así como la mucosa superior intraoral y dentadura superior. La rama mandibular aporta aferentes a la unión temporomandibular, el meato auditivo externo, propioceptores de los músculos, piel sobre mandíbula y labio inferior, mucosa intraoral baja, dientes y lengua anterior (Fig. 1A).

Dentro del sistema trigeminal, la vía que lleva la información desde las vibrisas o bigotes del hocico hasta la corteza somatosensorial encargada de su procesamiento tiene una importancia especial para el animal, como lo demuestra la rica inervación periférica y la desproporcionadamente grande representación en los mapas centrales (revisado en (Waite and Tracey, 1995). Toda nuestra experimentación se desarrolla en esta vía, el sistema de vibrisas-*barriles* de la rata (mencionado a veces con la forma genérica de *trigeminal*) y, en concreto, en los componentes de la vía que se encargan del procesamiento de la información mecanoceptiva epicrítica. En este capítulo exponemos, en primer lugar, una visión general del sistema, para entrar después en la descripción detallada de los principales núcleos de la vía implicados en nuestro estudio.

El órgano sensorial de las vibrisas se encuentra en el hocico de los roedores y está formado por una serie de bigotes o vibrisas que el animal mueve para localizar y reconocer objetos, diferenciar texturas, estimar una distancia, buscar comida, etc., siendo un órgano equivalente a los dedos de los primates. La información táctil obtenida por las vibrisas es transmitida a través del nervio infraorbitario (IoN), perteneciente a la división maxilar del nervio trigémino, hasta los núcleos del Complejo Sensorial del

Trigémino (CST) en el tronco encefálico, que constituye la primera estación de relevo de este tipo de información. De aquí, la información alcanza la región específica de la SmI, denominada corteza o campo de *barriles* (BF,



**Fig. 1.** Sistema trigeminal de la rata. A) Inervación de la cabeza y cara de la rata por las divisiones oftálmica (V1, morado), mandibular (V2, azul claro) y maxilar (V3, azul verdoso) del nervio trigémino. B) Somatotopía en la vía vibrisas-*barriles*. Las vibrisas del hocico están representadas en mapas isomórficos (se indica la orientación debajo de cada estructura) en cada uno de los relevos o núcleos de la vía aferente. Estos agregados centrales reciben el nombre de *barriletes* en tronco, *barriloides* en tálamo y *barriles* en corteza.

por sus siglas en inglés *Barrel Field*), por medio de dos vías: i) la lemniscal, que hace relevo en el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM), y ii) la paralemniscal, que hace relevo en el núcleo posterior del tálamo (PO).

En toda la vía existe una somatotopía muy precisa, de manera que en todos los núcleos implicados (en tronco, tálamo y corteza) las neuronas relacionadas con el procesamiento de la información táctil proveniente de las vibrisas forman unos agregados más o menos cilíndricos que se denominan *barriletes* en los núcleos del CST (Ma, 1991), *barriloides* en el VPM (Van Der Loos, 1976) y *barriles* en SmI (Woolsey and Van der, 1970). Estos agregados se ordenan dentro de cada núcleo representando fielmente el patrón de distribución de las vibrisas en el hocico (Fig. 1B).

### 2.1.1. Estructuras Periféricas

#### VIBRISAS

La almohadilla de vibrisas de la rata está formada por 26 grandes bigotes, o *macrovibrisas*, más 4 de mayor tamaño denominados *straddlers*. Los 26 bigotes se ordenan en cinco filas (A, B, C, D y E, de dorsal a ventral), conteniendo cada una de ellas diferente número de unidades (4 bigotes las filas A y B, 5 la C, 6 la D y 7 la E, Fig. 1B). Las vibrisas también están ordenadas en columnas (de la 1 a la 7, de más a más rostral), igualmente formadas por diferente número de unidades (cuatro bigotes de la fila 1 a la 4, 3 la 5, 2 la 6 y 1 la 7). Existe un gradiente de tamaño de estos bigotes, de manera que cuanto más dorsal y más caudal es una vibrisa, mayor es su tamaño. Las *straddlers* se organizan en una columna, caudal a la columna 1, recibiendo cada uno el nombre de una letra del abecedario griego:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , desde la más dorsal a la más ventral, respectivamente (Woolsey and Van der, 1970; Woolsey et al., 1975). El patrón de ordenación de los bigotes es muy consistente en roedores y está determinado genéticamente (Erzurumlu and Gaspar, 2012).

Las ratas utilizan las vibrisas para explorar y obtener información del ambiente que las rodea. El movimiento de vibrisas está sometido a un control muy fino por parte de la corteza, variando sus propiedades en función de las características del estímulo. En reposo o inactividad (cuando el animal no explora de forma activa su entorno) el animal no mueve sus vibrisas. El contacto inicial con un objeto provoca que éstas comiencen a moverse de forma rítmica a frecuencias muy bajas (<1 Hz). Por el contrario, cuando el



animal está explorando de forma activa su entorno, mediante el *whisking*, las vibrisas se mueven de manera rítmica en dirección postero-anterior a frecuencias de 4 a 12 Hz (Carvell and Simons, 1990).

Cada vibrisa tiene asociada en su base el *complejo folicular* de la vibrisa o folículo vibrisal, que incluye una serie de mecanorreceptores que se activan por la vibración del bigote, transduciendo esta señal al código neuronal. Los folículos presentan diferentes tipos de células receptoras: células de Merkel (mecanorreceptores de adaptación lenta), terminaciones lanceoladas, terminaciones reticulares de Ruffini (mecanorreceptores de adaptación lenta que responden a estrés tisular) y terminales nerviosas libres (nociceptores o termorreceptores; Fundin et al., 1994). Cada folículo está inervado por nervios superficiales y profundos, de los cuales un tercio son amielínicos y predominantemente sensoriales (el resto de los amielínicos son postganglionares simpáticos). El número de nervios que inervan cada folículo puede variar entre vibrisas de la misma fila; por ejemplo, estudios de microscopía electrónica han revelado que los folículos C1 y C4 están inervados por  $314,4 \pm 26,2$  y  $233,3 \pm 34,4$  nervios profundos, respectivamente (Crissman et al., 1991). El número de fibras mielínicas que inerva cada folículo también varía, en función de la posición de éste dentro de una fila, cuanto más caudal está el folículo más fibras mielínicas lo inervan (C-1 está inervado por 69 fibras frente a las 169 que inervan a C-6). También se han descrito inervaciones intervibrisales, con terminaciones lanceoladas transversales y longitudinales y varios tipos de terminaciones no mielinizadas (Fundin et al., 1995).

#### *NERVIO INFRAORBITARIO (IoN) y GANGLIO TRIGEMINAL (TG)*

La zona de vibrisas está inervada por el nervio infraorbitario (IoN), que pertenece a la división maxilar del nervio trigémino (V2). Los núcleos de la mayoría de las aferentes están en el ganglio trigémino (TG).

El ganglio trigémino se encuentra en la base del cráneo, en la fosa craneal media, y contiene entre 35000 y 50000 células (Lagares and Avendano, 2000). Las neuronas del ganglio son pseudomonopolares y pueden ser clasificadas globalmente en tipos A (grandes, con prolongaciones mielinizadas gruesas o medianas) y B (pequeñas, con prolongaciones finamente mielinizadas o amielínicas; Kai-Kai, 1989; Lagares and Avendano, 2000).

Los cuerpos neuronales de las aferencias primarias situados en TG muestran cierta organización somatotópica que refleja la localización periférica de los receptores. Anteromedialmente se sitúan los cuerpos celulares cuyas prolongaciones inervan la región oftálmica y maxilar, y posterolateralmente las que inervan la región mandibular. Dorsoventralmente las células están organizadas según inervan regiones periféricas dorsales o ventrales

La mayoría de las células ganglionares que inervan vibrisas carecen de actividad espontánea, pero se activan ante la estimulación de una vibrisa, frecuentemente a umbrales muy bajos. Un pequeño porcentaje de células (<10%), que probablemente se corresponden con los terminales nerviosos libres que se han encontrado en los folículos, requieren para su activación movimientos de gran velocidad o estímulos de gran intensidad.

### ***2.1.2. Complejo Sensorial del Trigémino (CST)***

La información sensorial, a través del ganglio trigémino, llega al complejo sensitivo trigeminal del tronco ipsilateral. Este complejo se extiende a lo largo de la porción lateral del tronco del encéfalo desde el puente hasta confundirse con el asta dorsal de la médula cervical. El CST está formado por el núcleo principal (Pr5) y el núcleo espinal (Sp5), que a su vez, está subdividido en tres núcleos: oral (Sp5o), interpolar (Sp5i) y caudal (Sp5c). Las fibras de las células ganglionares entran en el tronco encefálico por la raíz sensorial trigeminal, adyacente a la raíz motora del mismo nervio, y forman el tracto trigeminal (Tr5) que se sitúa adyacente al CST.

Todos los núcleos del CST reciben aferentes primarias de las vibrisas ipsilaterales, que terminan en zonas topológicamente organizadas. Una vez que entran en los núcleos del CST, las aferencias de las vibrisas hacen sinapsis en unos grupos neuronales ordenados fielmente al patrón de distribución de las vibrisas en la cara (salvo en el Sp5o donde tal distribución no es tan clara; Fig. 1B). Estos grupos neuronales tienen forma de cilindro y se denominan *barriletes* (Ma, 1991). Desde el CST, la información somatosensorial proveniente de las vibrisas alcanza la corteza por distintas vías paralelas. En general, aunque con ciertas limitaciones, estas vías ascendentes hacia el tálamo contralateral desde el CST se caracterizan en función de si alcanzan el VPM (lemniscal y extralemniscal) o el POM (paralemniscal).

## NÚCLEO PRINCIPAL DEL TRIGÉMINO (Pr5)

En la porción más rostral del CST se sitúa el núcleo Pr5, que tiene forma redondeada en su sección coronal y ovalada en la horizontal. Este núcleo está rodeado lateral y ventralmente por el Tr5, limitado caudalmente con el núcleo Sp5o y unido a éste de forma oblicua (Bates and Killackey, 1985).

El volumen medio del núcleo ha sido estimado en  $1,38 \pm 0,13 \text{ mm}^3$  y el número total de neuronas en  $31900 \pm 2200$  (Avendano et al., 2005), con una densidad celular de  $23100 \pm 2400 \text{ células/mm}^3$ . En su mayoría las células son de dos tipos: de tamaño medio (10-25  $\mu\text{m}$ ) con somas esféricos u ovalados, y de tamaño pequeño (<10  $\mu\text{m}$ ) con somas esféricos. Las neuronas forman agrupaciones y tienen árboles dendríticos muy ramificados que se extienden a través de la mitad del núcleo. En la parte dorsal se pueden observar algunas neuronas de mayor tamaño (>25  $\mu\text{m}$ ), con somas fusiformes, triangulares y esféricos (Bates and Killackey, 1985). Aunque tanto en la zona ventral como en la dorsal predominan las neuronas de tamaño pequeño y medio, parece que existen diferencias en su distribución. Más del 50% de las células en la parte dorsal tienen un diámetro superior a 10  $\mu\text{m}$ , mientras el 70% de las neuronas en la parte ventral tienen un diámetro entre 6 y 9  $\mu\text{m}$  (Ma, 1991).

Las células de la parte ventral se agrupan y organizan en formaciones citoarquitectónicas muy definidas, descritas anteriormente como *barriletes* (Belford and Killackey, 1979; Ma, 1991). La información táctil que viene desde las vibrisas termina en los *barriletes*. Los *barriletes* tienen forma más o menos cilíndrica, con una capa de alta densidad celular en la superficie del cilindro que rodea un espacio libre de células formando la luz del cilindro. Las neuronas de los *barriletes* de Pr5 responden a la estimulación de muy pocas vibrisas, generalmente sólo a una (entre el 67% y el 80%; Golden et al., 1997). Todas las neuronas de un mismo *barrilete* presentan la misma “vibrisa principal”, de manera que se puede identificar cada *barrilete* con una determinada vibrisa. La disposición de los *barriletes* presenta una somatotopía muy precisa, reproduciendo la ordenación de las vibrisas del hocico del animal (Fig. 1B). Los *barriletes* correspondientes a la fila A se sitúan mediales en el núcleo, mientras que los corresponden a la fila E se encuentran laterales. En la zona más ventral se localizan los *barriletes* de la fila de las *straddlers*.

El marcado intracelular y la inyección de trazadores han determinado dos tipos principales de neuronas de proyección en el Pr5: neuronas pequeñas con árboles

dendríticos dentro del espacio de un *barrilete* (neuronas de tipo *barrilete*) y células grandes con árboles dendríticos fuera del *barrilete* (neuronas *interbarrilete*; Jacquin et al., 1988). El patrón de los *barriletes* en Pr5 se desarrolla antes del nacimiento (Chiaia et al., 1992) y es dependiente del IoN. Las neuronas de proyección trigémino-talámicas del Pr5 comunican este patrón al VPM y este núcleo a su vez, determina el mismo patrón en los *barriles* de la corteza (Erzurumlu and Kind, 2001).

El Pr5 recibe aferencias del resto de núcleos del CST pero, por el contrario, tiene una proyección muy débil hacia cada uno de los núcleos espinales (Jacquin et al., 1990). La principal proyección eferente del Pr5 es contralateral hacia el tálamo (a los núcleos VPM y POm, Fig. 1B) y de naturaleza excitatoria. Esta proyección sale preferentemente de la zona ventral (que es la región asociada a vibrisas) donde el 70% de las neuronas se activan antidrómicamente por estimulación eléctrica desde el tálamo (Jacquin et al., 1988). Hay también una pequeña proyección ipsilateral desde la zona más rostral de la parte dorsal del núcleo. La proyección desde Pr5 representa el 60-70% de las aferencias trigeminales que recibe VPM.

### **2.1.3. Complejo VentroPosterior Talámico**

La información sensorial de las vibrisas llega hasta la corteza somatosensorial principalmente a través del VPM (la parte medial del complejo ventroposterior o ventrobasal talámico) y parte del POm (porción medial del núcleo posterior). Las aferencias a VPM y POm llegan principalmente de Pr5, Sp5i, y Sp5c. POm también recibe proyecciones de Sp5o (revisado en Waite and Tracey, 1995).

El VPM contiene una población homogénea de neuronas multipolares de tamaño medio. Estas células de relevo tálamo-corticales son excitatorias y proyectan principalmente a la capa IV y parte profunda de la capa III (la localización anatómica de un *barril*) de la corteza somatosensorial. No se han descrito interneuronas o neuronas GABAérgicas en el núcleo VPM (Barbaresi et al., 1986). Las entradas inhibitorias llegan del núcleo reticular talámico (RT). La mayoría de las células en VPM se activan a través de receptores de glutamato de tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato) y AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato).

La información procedente de las vibrisas, desde el CST, llega a VPM de una forma somatotópicamente organizada. Al igual que en Pr5, las aferencias de cada vibrisa

terminan sobre células organizadas en agregados discretos que, en este caso, se denominan *barriloides* (Land et al., 1995; Van Der Loos, 1976). Cada *barriloide* contiene entre 250 y 300 neuronas. Existe una correspondencia entre cada *barriloide* y una única vibrisa, de manera que en este núcleo existe una somatotopía muy precisa: la fila más dorsal de las vibrisas (fila A), está representada en la porción más caudal del VPM, mientras la fila más ventral de vibrisas (fila E), está representada rostralmente. Aunque tradicionalmente no se han considerado subdivisiones internucleares dentro de VPM, estudios electrofisiológicos y de trazado neuroanatómico han identificado dos sectores que proyectan a corteza a través de vías separadas: la región dorsomedial (VPMdm) y la región ventrolateral (VPMvl). VPMdm es la región donde aparecen la “cabeza” y “cuerpo” de los *barriloides* y supone la principal proyección a SmI. Las células de un *barriloide* proyectan predominantemente al centro de un *barril* (Land et al., 1995). VPMvl recoge la “cola” de los *barriloides* y proyecta mayoritariamente a la corteza somatosensorial secundaria SmII (Pierret et al., 2000). Ramificaciones colaterales de la proyección tálamocortical (TC) activan el núcleo RT y proporcionan el *feedback* a VPM y POm.

El PO rodea a VPM por sus partes dorsomedial y caudal. La parte más rostral, el sector dorsomedial (POm) recibe aferencias de la totalidad de la superficie corporal y está topográficamente organizado, mientras que el sector caudal recibe entradas convergentes de naturaleza somática, auditiva y sensorial, carece de organización topográfica y proyecta a SmII. Las aferencias trigeminales a POm llegan desde Pr5 y Sp5i pero terminan de forma mucho más difusa que en el caso de VPM. Menos de la mitad de las células de POm se activan por el movimiento de vibrisas (revisado en Waite and Tracey, 1995).

Las principales aferencias trigeminotalámicas vienen de los núcleos Pr5 y Sp5i. Mediante el empleo de técnicas de marcado se ha determinado que el 68% de las neuronas de proyección del Pr5 tiene un campo receptivo limitado a una sola vibrisa y proyectan al VPMdm, terminado en forma matosa en un solo *barriloide*. El resto, el 32% tiene un campo receptivo que incluye varias vibrisas y proyecta a POm, la zona incerta, tectum y muy poco a VPM. Sólo el 2% de las neuronas del Sp5c proyectan a tálamo. Estas proyecciones (más largas y más finas que las que salen de Pr5; revisado en Martin et al., 2014) acaban principalmente en zonas periféricas de los *barriloides* de VPM y septos inter**barriloides** (Veinante et al., 2000).

#### 2.1.4. Corteza Somatosensorial Primaria

La región facial de SmI en la rata está dominada por las aferencias que traen la información somatosensorial procedente de las vibrisas: la corteza o el campo de *barriles* (BF). Este nombre se debe a los agregados celulares especializados, denominados *barriles*, que aparecen en capa IV y que replican el esquema de vibrisas en el hocico del animal (Woolsey and Van der, 1970). Dentro del BF, se diferencian, a su vez, dos subcampos de *barriles*. El subcampo anterolateral (ALBSF, por sus siglas en inglés *AnteroLateral Barrel SubField*), representado por pequeños y medianos *barriles* correspondientes a los senos pilosos situados sobre los labios y almohadilla bucal pilosa, y el subcampo posteromedial (PMBSF, por sus siglas en inglés *PosteroMedial Barrel SubField*), donde se encuentran *barriles* de mayor tamaño, correspondientes a las grandes vibrisas especializadas y móviles del hocico del animal (Land and Erickson, 2005). En este trabajo cuando hablamos de *barriles* o corteza de *barriles*, siempre nos referimos a PMBSF.

Cada *barril* de capa IV tiene un diámetro aproximado de 200-400  $\mu\text{m}$  y consiste de una zona central de baja densidad celular, rica en aferencias talámicas y sinapsis, rodeada por una pared circular de mayor densidad celular. Los *barriles* contienen tanto células lisas como estrelladas espinosas. Los espacios *interbarril* o *septos* están empaquetados densamente y constituidos mayoritariamente por dendritas orientadas verticalmente y fibras intracorticales (revisado en Waite and Tracey, 1995). Las células estrelladas normalmente tienen dendritas restringidas a un *barril*, dirigidas hacia su centro. Sin embargo, un pequeño porcentaje proyecta hacia el septo y los *barriles* vecinos (Petersen and Sakmann, 2000). Aproximadamente el 15% de las células del *barril* contienen GABA (ácido gamma amino butírico) y son inhibitorias. También aparecen células y fibras inmunorreactivas a VIP (péptido intestinal vasoactivo), especialmente en las paredes del *barril*, que podrían colocalizar con GABA.

#### ORGANIZACIÓN COLUMNAR DE LA CORTEZA DE *BARRILES*

El dominio neuronal de cada *barril* se extiende en *columnas* a través de todas las capas corticales (Simons and Woolsey, 1979). Las proyecciones TC a PMBSF se dividen anatómicamente en, al menos, tres vías separadas (revisado en Haidarliu et al., 2008):

1. Vía lemniscal: lleva la información somatosensorial y específica desde Pr5 a la zona de *barriloides* del VPMdm, y termina en la zona granular de la corteza de *barriles*.
2. Vía extralemniscal: lleva información multivibrisa desde la parte caudal del Sp5i a la zona del VPMvl, y termina en SmII y zona disgranular de la corteza de *barriles* a través de colaterales (Pierret et al., 2000; Yu et al., 2006).
2. Vía paralemniscal: lleva información multisensorial y global (multivibrisa) desde la parte rostral del Sp5i al POm y termina en la zona disgranular del campo de *barriles* de la corteza.

Estas proyecciones TC se concentran verticalmente en diferentes capas corticales, y horizontalmente en los *barriles* o los espacios *interbarril* (septos). Las neuronas de capa IV, principales receptoras de las aferencias de la vía lemniscal, proyectan a todas las capas dentro de su propia columna, aunque principalmente a otras células de capa IV y a las neuronas piramidales de capa II/III. En las capas supragranulares, las neuronas excitatorias están funcionalmente segregadas de acuerdo a la localización de sus somas con respecto a los *barriles* y septos de la capa granular. Estas neuronas Pyr de capas II/III “relacionadas a una columna”, localizadas sobre los *barriles*, responden más activamente a la estimulación de vibrisas que aquellas “relacionadas a los septos” (Brecht et al., 2003). Recientemente se ha mapeado la densidad de proyecciones de VPM y POm y sus terminales presinápticos usando proteína fluorescente citoplásmica o específica de botones terminales (Wimmer et al., 2010). Estos autores han mostrado y cuantificado los axones de VPM y POm que forman haces orientados verticalmente con los *barriles* y septos de capa IV, respectivamente. Ambas proyecciones TC se complementan a lo largo de la profundidad cortical, definiendo una columna dividida en capas y subcapas invadas en distintos grados por VPM y POm. VPM no sólo proporciona aferencias al centro de cada *barril* de capa IV, extendiéndose a la capa III profunda (IIIp), sino que también emite colaterales a las capas Vb y VI. Las aferencias de VPM sinaptan tanto con células lisas y estrelladas de capa IV y otras neuronas Pyr dentro de cada columna. Las células Pyr de las capas supragranulares tienen extensos árboles dendríticos que se extienden principalmente en su propia columna, aunque también pueden hacer contacto con otras columnas adyacentes. Esta organización columnar, determinada por los árboles axónicos y dendríticos, también se refleja en columnas funcionales, como se demuestra en los estudios de actividad metabólica (Kossut et al., 1988) y funcional (Petersen, 2007).

## PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN LA CORTEZA DE *BARRILES*

Las células de cada *barril* responden preferencialmente a la información procedente de una única vibrisa, la *vibrisa principal*, y menos efectivamente a las vibrisas de alrededor (Brecht et al., 2003). Las células dentro de cada columna cortical comparten la misma vibrisa principal, aunque las respuestas pueden variar en función de la capa.

La información sensorial procedente de una vibrisa alcanza SmI a través de la densa innervación glutamatergica TC. El axón de una neurona de VPM inerva principalmente la capa IV de un único *barril* somatotópicamente alineado. La fuerte inhibición GABAérgica desde el núcleo RT previene la prolongada despolarización de las células de VPM y agudiza la duración del estímulo sensorial sobre la corteza. Los axones talámicos hacen sinapsis sobre una diversidad de dendritas de la capa IV. Los elementos dendríticos más importantes están proporcionados por las neuronas excitatorias e inhibitorias de capa IV, con una fracción adicional de las que llegan de las capas infragranulares (fundamentalmente dendritas apicales de capa Vb). Las neuronas excitatorias de capa IV tienen árboles axonales y dendríticos confinados lateralmente a un único *barril*, y la entrada talámica que llega a un único *barril* de capa IV permanece, por tanto, confinado a este *barril* para el paso inicial del procesamiento cortical. Los axones excitatorios de capa IV inervan las capas II/III inmediatamente situadas por encima. Funcionalmente, la propagación columnar de la actividad comienza con la despolarización en el *barril* de capa IV y en los milisegundos (ms) subsiguientes llega a despolarizar las neuronas de capa II/III (Armstrong-James et al., 1992). Las células Pyr de capa II/III proyectan tanto dentro de su propia columna como a mayor distancia a otras columnas. Estas neuronas contactan con células de todas las capas corticales, excepto de capa IV, aunque la conexión más fuerte es con otras Pyr de capa II/III y con finos penachos de las neuronas Pyr de capa Vb. Las neuronas de capa Va, principales receptoras de la vía paralemniscal, proyectan fuertemente dentro de su propia columna a otras células de capa V y a células de capa II distribuidas en múltiples columnas y localizadas principalmente en los septos. Estas neuronas de capa II reciben además entradas de las neuronas de capa III, proporcionando uno de los posibles puntos de convergencia para las vías lemniscal y paralemniscal. La aferencia inhibitoria a las neuronas excitadoras viene de células localizadas tanto dentro de la misma capa cortical como de células situadas en diferentes capas (revisado en Bosman et al., 2011).



El PMBSF forma conexiones recíprocas con distintas áreas corticales, incluyendo la región de vibrisas de la corteza somatosensorial secundaria (SmII), la corteza motora primaria (M1), y las cortezas insular y perirrinal. El PMBSF contralateral se alcanza a través de la proyección callosa. Las proyecciones axonales a SmII se originan desde las capas infra y supragranular del PMBSF, y forman arborizaciones por todas las capas de SmII. La proyección de SmI a M1 está somatotópicamente organizada, de forma que cada columna de SmI conecta con la columna de la misma vibrisa en M1. Las células Pyr de las capas II/III de SmI inervan densamente las capas V/VI de M1. La mayoría de las conexiones a M1 viene de neuronas localizadas en las columnas septales. Las proyecciones recíprocas, de M1 a SmI, inervan principalmente las capas V/VI y I. La corteza de *barriles* también proporciona *feedback* al VPM, POm y a las neuronas GABAérgicas de RT, principalmente desde células situadas en las capas V/VI. Estas eferencias también siguen una somatotopía. Las proyecciones de una misma columna cortical que terminan en VPM lo hacen en un arco curvado que incluye varios *barriloides*. Las células que proyectan a VPM y POm envían colaterales a RT, que también recibe aferencias desde las neuronas de capa cortical V.

## 2.2. PLASTICIDAD CEREBRAL

### 2.2.1. Definición, Tipos y Mecanismos neurobiológicos implicados

La neuroplasticidad es la capacidad dinámica del sistema nervioso para reorganizarse a sí mismo ante estímulos intrínsecos y extrínsecos, modificando para ello su estructura, función o circuitería (Cramer et al., 2011). Lejos de la visión clásica de un cerebro inmutable una vez acabado el período crítico del desarrollo, la plasticidad cerebral es un proceso continuo. Esta idea fue ya descrita por Cajal en 1894, quien definió que la plasticidad de los procesos celulares es dinámica y opera a lo largo de toda la vida del individuo, siendo máxima durante la infancia y adolescencia, más baja en la vida adulta y muy escasa o casi inexistente durante la vejez (revisado en DeFelipe, 2006).

La neuroplasticidad ocurre durante el desarrollo, en respuesta a estímulos del ambiente, en los procesos de aprendizaje y memoria o en respuesta a lesiones centrales y periféricas. El estudio de la neuroplasticidad es un campo extremadamente amplio que está investigado a múltiples niveles desde moléculas a comportamiento, pasando por los sistemas neurales. Desde los trabajos pioneros del grupo de Merzenich (Merzenich et

al., 1983a; Merzenich et al., 1983b) se han sugerido distintas hipótesis subyacentes a la plasticidad, que van desde el nivel ultraestructural al nivel representacional (para excelentes revisiones, ver Calford, 2002; Duffau, 2006; Fox, 2002). Aquí trataremos de hacer una revisión global de distintos mecanismos de plasticidad, para profundizar después, en los capítulos siguientes, en aquellos mecanismos implicados en la plasticidad “natural” inducida por la desaferentización periférica y la plasticidad “guiada” terapéuticamente a través de la neuroestimulación, respectivamente.

## 1. Mecanismos *microscópicos* de plasticidad:

1.1. *Durante la ontogenia*. La plasticidad ocurre en diferentes estadios del desarrollo (Holmes and McCabe, 2001): i) cito- e histo-génesis, con la proliferación y elaboración de las prolongaciones dendríticas y axonales; ii) período de migración, formación de sinapsis y diferenciación celular; y iii) organización precisa de la circuitería, a través de fenómenos de apoptosis, regresión axonal, y eliminación de células y sinapsis. Este remodelamiento final permite suprimir las redes superfluas, aumentar la especificidad de cada circuito (particularmente mediante el reforzamiento, de acuerdo al concepto Hebbiano) y aumentar el potencial plástico del sistema.

1.2. *Modulación de la fuerza sináptica*. La alteración de la excitabilidad y la sincronización de la red son claves para las dos reglas sinápticas de aprendizaje, que influyen en la sinaptogénesis y la plasticidad del SNC: 1) los mecanismos de plasticidad Hebbianos (Cruikshank and Weinberger, 1996; Hebb, 1950) que favorecen el *cabado* de las vías neuronales y 2) los mecanismos de plasticidad homeostática (Desai, 2003) que aseguran que las neuronas reciben una cantidad adecuada de entrada sináptica.

Además de las modificaciones estructurales como un aumento en el tamaño y número de sinapsis durante el aprendizaje, la sinapsis por sí misma no puede considerarse como algo “estático”, sino como una conexión dinámica, con propiedades plásticas que subyacen al remodelamiento funcional tanto a nivel micro como macroscópico. La repetición de estímulos altera el proceso de la transmisión sináptica: la estimulación subsiguiente de la membrana presináptica genera un aumento (o un descenso) en la influencia de la neurona postsináptica. Esta plasticidad sináptica dependiente de actividad es inducida localmente, a nivel de las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria, y parece tanto suficiente como necesaria para el almacenamiento de información. Tal proceso permite un control dinámico del flujo de la información dentro de las redes neuronales, y explica los fenómenos de potenciación

a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés *long-term potentiation*) y depresión a largo plazo (LTD) (para una excelente revisión de los conocimientos actuales sobre la regulación de la LTP y LTD y el papel de estos eventos en la formación de la memoria ver Malenka and Bear, 2004).

Algunas sinapsis además pueden auto-regularse por sí mismas, mediante lo que se conoce como “metaplasticidad” (para más información, ver Fischer et al., 1997). De acuerdo con la regla de Hebb (Hebb, 1950), que postula que el aprendizaje y la memoria están basados en modificaciones de la fuerza sináptica entre neuronas que son activadas simultáneamente (revisado en Sejnowski, 1999), se demostró, por ejemplo, que el aprendizaje de aptitudes motoras fortalecía conexiones horizontales en M1 a través del mecanismo de LTP, pero no en la M1 ipsilateral al miembro entrenado (Rioult-Pedotti et al., 2000). Sin embargo, a pesar de los numerosos datos que apoyan que la plasticidad es necesaria para el aprendizaje y la memoria, pocos datos actualmente apoyan la noción de suficiencia.

Finalmente los mecanismos de estabilización sináptica, especialmente a través de la regulación de los receptores AMPA, constituyen la plasticidad homeostática (Desai, 2003), esencial para equilibrar los procesos de plasticidad Hebbiana (Cruikshank and Weinberger, 1996).

1.3. *Alteraciones en la expresión génica.* LTP y LTD describen cambios a largo plazo en la eficiencia de la transmisión sináptica que ocurren en respuesta a una estimulación repetida. Este tipo de plasticidad a largo plazo requiere cambios en la expresión génica. De hecho, la LTP no persiste cuando se inyecta a los animales inhibidores de la síntesis proteica (revisado en McClung and Nestler, 2008). En un principio se consideró que la síntesis proteica sólo era necesaria para la inducción de la fase tardía de la LTP/LTD, pero estudios posteriores mostraron que la fase temprana de la LTP puede ser también dependiente de la síntesis proteica cuando hay altos niveles de activación sináptica, y que el requerimiento para nueva síntesis proteica puede expandirse una vez pasada la inducción de la LTP, dependiendo del grado de estimulación sináptica.

La expresión génica está controlada por una serie de proteínas de unión al ADN conocidas como factores de transcripción. Con la estimulación celular, los factores de transcripción son modificados para poder entrar al núcleo, cambiar la estabilidad proteica, potenciar la unión al ADN o favorecer su unión a co-factores esenciales.

Varios estudios han identificado factores de transcripción específicos que son importantes en la persistencia de la LTP y LTD, y otras formas de plasticidad neural y comportamental. Algunos de estos factores, ampliamente estudiados en el contexto de la plasticidad neural en adulto, son la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc o factor *CREB* (por sus siglas en inglés *cAMP response element-binding protein*; Barth et al., 2000), la familia Fos (incluyendo cFos, FosB, etc.) o el factor de transcripción NF-kB. Otras alteraciones de la expresión génica que llevan a plasticidad neural, incluyen procesos de modificación de la cromatina (modificaciones a histonas y metilación del ADN) o modificaciones post-transcripcionales (factores de poliadenilación, microARNs, etc.).

1.4. *Sincronización*. La sincronización dentro de una red funcional es crucial. Por ejemplo, se requiere una sincronización precisa entre los parámetros temporales de la electroestimulación episódica del núcleo basal magnocelular (NBM) y de un estímulo auditivo para generar una reorganización masiva de la corteza auditiva primaria (Kilgard and Merzenich, 1998).

Como hemos comentado previamente, la plasticidad puede considerarse a nivel de cambios en la actividad de neuronas aisladas, en la eficacia sináptica o en las relaciones temporales entre conjuntos de neuronas en bandas específicas de oscilación. La combinación de estos mecanismos podría llevar a una modulación del comportamiento a través de una reorganización de las redes elocuentes, y a través de la elaboración de las actuales “neo-redes”. Recientes modelizaciones matemáticas han tratado de medir la conectividad efectiva, usando análisis de coherencia parcial de datos de fMRI (imagen de resonancia magnética funcional). Tales conceptos están siendo también estudiados *in silico*, usando modelos de redes neurales de las funciones corticales basadas en las propiedades computacionales de la corteza (Rossini and Dal Forno, 2004).

1.5. *Desenmascaramiento de las conexiones y redes latentes*. Debido a la organización dinámica de los mapas funcionales, la estabilidad de las representaciones corticales es mantenida por una red de interneuronas inhibitorias GABAérgicas (Jacobs and Donoghue, 1991). En condiciones normales, estas neuronas bloquean las conexiones horizontales, particularmente entre neuronas Pyr. Sin embargo, si esta inhibición es suprimida, tras privación sensorial o aprendizaje, estas conexiones intracorticales se convierten en funcionales (Jain et al., 1998; Rioult-Pedotti et al., 2000). Este “desenmascaramiento” de las conexiones latentes, que permite la

transformación de sinapsis latentes a sinapsis funcionales, representa un mecanismo fundamental de la plasticidad a corto plazo. Este proceso es facilitado por las propiedades de organización de la conectividad de las redes tálamo-corticales, y por mecanismos capaces de cambiar rápidamente el nivel de excitabilidad de las neuronas y de la transmisión sináptica (a través de una disminución en la inhibición GABAérgica).

1.6. *Modificaciones estructurales.* Numerosas modificaciones fenotípicas de neuronas y glía han sido demostradas en estudios de plasticidad.

A nivel neuronal, la ramificación de espinas dendríticas y prolongaciones axonales, o neosinaptogénesis, ha sido observada *in vitro* y en modelos animales. La plasticidad dependiente de experiencia de los campos receptivos corticales está acompañada por un aumento del intercambio sináptico, sugiriendo que la experiencia lleva a la formación y eliminación de sinapsis y que estos cambios podrían subyacer al remodelamiento adaptativo de los circuitos neurales. Este tipo de plasticidad es inducida también por daño al SNC y SNP (tema que será revisado ampliamente en el siguiente capítulo). Se han observado cambios estructurales (en número, tamaño y forma de las espinas dendríticas, por ejemplo) a corto plazo tras el daño, posiblemente debidos a la síntesis de nuevas proteínas. También se ha sugerido la participación de factores de crecimiento y neurotrofinas. El papel de los receptores AMPA y de las integrinas en la estabilización de los cambios morfológicos ha sido subrayado como otro mecanismo de plasticidad homeostática.

La glía está involucrada en el control del número de sinapsis. Adicionalmente, los astrocitos exhiben un alto grado de plasticidad fenotípica. Su morfología cambia durante la migración neuronal, maduración y degeneración, sugiriendo que los astrocitos deben re-ajustarse constantemente a los cambios en el ambiente cerebral (Papa et al., 2014).

1.7. *Neurogénesis.* Se ha demostrado, en contra del dogma que afirmaba que no podían aparecer nuevas neuronas en el cerebro de mamífero adulto, que existe neurogénesis en el bulbo olfativo, el giro dentado e incluso en el neocórtex de roedores y primates adultos (Gould and Gross, 2002). Estas nuevas neuronas podrían jugar un importante papel en el aprendizaje y la memoria, a través de la modificación de circuitos neuronosinápticos, la elaboración de nuevas conexiones entre ellos o el desarrollo de nuevas redes (revisado en Gross, 2000). La neurogénesis también podría estar implicada en la plasticidad inducida por lesión. Tras lesión cortical en ratón adulto,

precursores neurales endógenos pueden ser generados *in situ*, para diferenciarse a neuronas maduras, en áreas corticales en las que la neurogénesis no tiene lugar (Magavi and Macklis, 2002).

1.8. *Modulación de la actividad neuronal por la glía*. Las células gliales juegan un importante papel en la modulación de la actividad neuronal (Papa et al., 2014). Debido a su localización anatómica entre las sinapsis y los vasos sanguíneos, los astrocitos representan una interfaz esencial en el acoplamiento neuro-vascular a través de la regulación de la energía metabólica. A través de la liberación de neurotransmisores y otras moléculas de señalización extracelular, la glía puede afectar la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, y coordinar la actividad a lo largo de las redes de neuronas. La glía puede también comunicarse con otras células gliales a través de ondas intercelulares de calcio, uniones tipo *gap*, y difusión intercelular de mensajeros químicos, constituyendo una red glial que permite tanto “escuchar” como “hablar” a los circuitos neuronosinápticos.

1.9. *Otros factores*. La influencia de neurotrofinas, ambiente social (como los estudios de ambiente enriquecido), estrés y ejercicio sobre la plasticidad neural y comportamental han sido también estudiados, con posibles interacciones entre todos estos factores (Cotman and Berchtold, 2002).

## 2. Mecanismos *macroscópicos* de plasticidad:

Los cambios ultraestructurales pueden llevar a la reorganización funcional a una escala macroscópica, a través de algunos de los mecanismos que describimos a continuación.

2.1. *Diasquisis*. El término diasquisis hace referencia a los cambios funcionales (electrofisiológicos, metabólicos, hemodinámicos) que aparecen en estructuras distantes del foco de la lesión o daño cerebral, pero que estaban conectadas de algún modo con ese foco (para más información, ver Nguyen and Botez, 1998).

2.2. *Reorganización intrínseca dentro de áreas elocuentes: redundancias funcionales*. Debido a la organización dinámica de las áreas elocuentes, con múltiples representaciones corticales de la misma función dentro de la misma región (“redundancia funcional”), una lesión implica que un lugar elocuente discreto puede ser compensado por el reclutamiento de sitios redundantes adyacentes. Estas redundancias

funcionales, localizadas dentro de la región dañada, pueden ser “desenmascaradas” tras el daño, que provoca una hiperexcitabilidad local (Jacobs and Donoghue, 1991) o fenómenos de plasticidad *maladaptativa*.

2.3. *Reorganización dentro de redes funcionales*. En lesiones amplias, la redistribución dentro del área podría no ser suficiente para restaurar la lesión. Otras regiones pertenecientes a la misma red funcional podrían ser reclutadas: primero, áreas perilesionales; después, si la compensación funcional es todavía insuficiente, estructuras remotas ipsi-hemisféricas. Finalmente, y debido a la inhibición transcallosa, estructuras homólogas funcionales del hemisferio contralateral también podrían ser reclutadas (revisado en Duffau, 2006).

2.4. *Plasticidad entre modalidades sensoriales distintas o “transmodal”*. Equipado con múltiples sentidos y órganos sensoriales especializados, el sistema nervioso es capaz de capturar e interactuar con un rico ambiente multisensorial. El resultado unificado de nuestras experiencias sensoriales es el producto de conexiones neurales extensas y dinámicas que, a su vez, están altamente influenciadas por nuestras experiencias previas y eventos del desarrollo. Tradicionalmente, la vida sin un determinado sentido se consideraba empobrecida y muchas teorías postularon que la privación sensorial podría tener efectos devastadores sobre el desarrollo, aprendizaje y el comportamiento cognitivo. La teoría de la deficiencia apoyaba que la pérdida de una determinada experiencia sensorial perceptual podría llevar al desarrollo aberrante de aptitudes cognitivas, dado que la adecuada integración multisensorial podía resultar sólo del normal desarrollo de cada sentido. Sin embargo, en nuestros días, está claro que esto no es así. En individuos ciegos o sordos se producen finos remodelamientos para ajustar su pérdida sensorial y operar eficientemente dentro del ambiente. Estudios en humanos y animales indican que estas adaptaciones están inexorablemente ligadas a cambios a múltiples niveles del cerebro. En particular, parece que estos cambios implican no sólo las áreas responsables del procesamiento de los sentidos remanentes sino también áreas normalmente asociadas con el procesamiento de la modalidad sensorial que se ha perdido. Cuando las lesiones o la privación implican muchos epicentros dentro de una red funcional, el reclutamiento de estructuras inicialmente no pertenecientes a este circuito elocuente es posible: es lo que se conoce como plasticidad *transmodal*. En animales y humanos congénitamente ciegos se ha observado un acoplamiento espacial auditivo más desarrollado debido a un reclutamiento inicial de la corteza visual,

mientras que en adultos congénitamente sordos la corteza auditiva se recluta durante la estimulación visual. Además, se ha demostrado que los animales ciegos y sordos tienen una mayor capacidad de discriminación táctil, y que activan las cortezas auditiva y visual, respectivamente, durante la realización de acciones somatosensoriales (revisado en (Merabet and Pascual-Leone, 2010).

Estos cambios neuroplásticos podrían considerarse adaptativos, puesto que llevan a la adquisición de capacidades comportamentales y de realización de tareas de igual eficacia, o incluso superior, a la de los individuos sin patología inicial. En otras situaciones, sin embargo, los cambios neuroplásticos podrían ser maladaptativos, particularmente de cara a los esfuerzos de rehabilitación que intentan restaurar la función sensorial una vez que ésta se ha perdido o ha fallado en el desarrollo.

**2.5. Estrategias compensatorias.** Cuando las áreas de asociación unimodal, capaces de participar en la restauración funcional, son también dañadas, las áreas de asociación heteromodal como la corteza prefrontal dorso-lateral o la corteza intraparietal podrían ser reclutadas. Esto no es un proceso plástico en sentido estricto, sino más bien la elaboración de estrategias cognitivas compensatorias (Rossini and Dal Forno, 2004).

**2.6. Cambios morfológicos macroscópicos.** Las modificaciones ultraestructurales y la neurogénesis pueden generar cambios morfológicos macroscópicos, detectados tanto en plasticidad dependiente de experiencia, como en aquella inducida tras lesión. Los cambios morfológicos subsiguientes a la desaferentización serán tratados extensamente en el capítulo siguiente. Algunos ejemplos gráficos sobre plasticidad y cambios estructurales macroscópicos son, por ejemplo, el tamaño del *planum temporales* es un marcador anatómico de la especialización hemisférica para la comprensión del lenguaje, el volumen del cerebelo y el área de Broca está aumentado en músicos profesionales, el volumen de las estructuras mesio-temporales podría correlacionarse al reconocimiento de caras, o el volumen del hipocampo es mayor en taxistas.

### **2.2.2. Implicaciones y aplicaciones de la neuroplasticidad.**

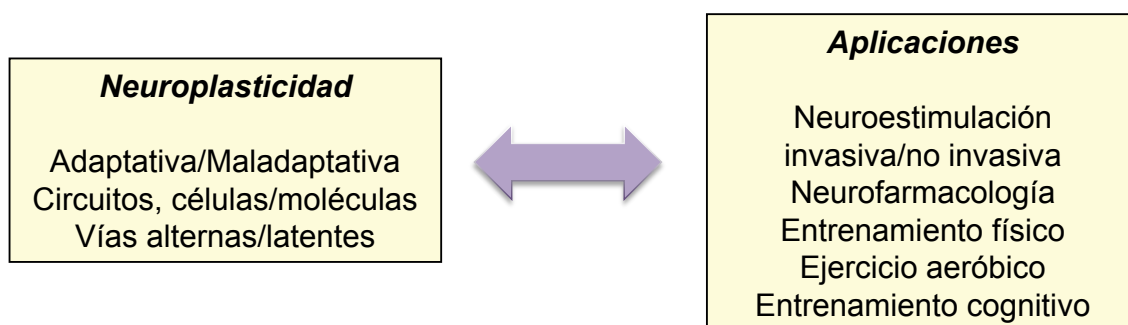
Una propiedad del sistema nervioso como la plasticidad que abarca tantos niveles (neural, sináptico, topográfico, funcional, morfológico, etc.) y situaciones, y que opera a lo largo de toda la vida, no puede ser fácil y simplemente clasificada. En la bibliografía a menudo se habla de plasticidad inducida por actividad (aprendizaje, entrenamiento,



enriquecimiento) y una plasticidad inducida por lesión. Esta última, a su vez, puede dividirse en lesión al SNC (por ejemplo tras accidente cerebrovascular- ACV) y lesión al SNP (por ejemplo tras desaferentización, que será abarcada extensamente en el capítulo siguiente).

La existencia de la neuroplasticidad implica obviamente resultados positivos o adaptativos (como aprendizaje o memoria, o cierta recuperación tras lesiones isquémicas, por ejemplo) pero también negativos o que alteran la percepción, como aquéllos consecuencia de reorganizaciones aberrantes de los mapas neurales que originan patologías del tipo de la tinitus, dolor neuropático o miembro fantasma.

El conocimiento cada vez más ampliado de los mecanismos que subyacen a los cambios neuroplásticos adaptativos, tanto en el desarrollo como en el aprendizaje o en el intento del propio SN de “repararse” tras lesión, está llevando a la definición y aplicación de interesantes herramientas terapéuticas basadas en la plasticidad y dirigidas a la neurorrehabilitación, neurorreparación, neuroprotección e incluso neuropotenciación (Fig. 2). Algunas de estas intervenciones basadas en neuroplasticidad incluyen nuevos métodos de rehabilitación integral, neurofarmacología, entrenamiento físico y cognitivo y distintas formas de neuroestimulación (tanto central como periférica, e incluso concomitantes; para una excelente revisión ver Cramer et al., 2011). Debido a la importancia de la literatura sobre plasticidad inducida por neuroestimulación, que supone el núcleo central de esta Tesis, abordaremos estos mecanismos y perspectivas en capítulos amplios e independientes (ver capítulos 2.4. *Neuroestimulación y Plasticidad*, y 2.5. *Desaferentización, Neuroprótesis y Plasticidad*).



**Fig. 2.** Resumen conceptual de la relación entre neuroplasticidad y aplicaciones terapéuticas inductoras de plasticidad.

## 2.3. DESAFERENTIZACIÓN Y PLASTICIDAD

La estrecha relación de necesidad y cooperación entre el SNC y el SNP determina que cualquier alteración *negativa* de la entrada sensorial provoque una modificación en el SNC. La magnitud, tipología y permanencia de los cambios en el SNC dependerá, entre otros factores, del tipo de lesión (reversible o crónica) y estructura afectada (nervio, raíz dorsal, núcleos del cordón posterior, amputación), de la edad del sujeto, y del sistema sensorial afectado.

Durante décadas, se consideró que sólo el SNC en desarrollo o durante un período crítico post-natal era capaz de reorganizarse, estructural y funcionalmente, tras lesión a las neuronas periféricas (Hensch, 2005). Este dogma fue puesto en entredicho tras los estudios pioneros de Liu y Chambers en la médula espinal de gatos (Liu and Chambers, 1958), y, más recientemente, los ya clásicos trabajos del grupo de Merzenich (Merzenich et al., 1983a; Merzenich et al., 1983b) en la corteza cerebral del mono adulto. A partir de este momento, y durante estas tres décadas, todas las evidencias experimentales han mostrado que el cerebro adulto también es capaz de remodelarse tras lesión. Estos cambios van desde alteraciones estructurales a reorganizaciones de los mapas neurales y han sido mostrados no sólo en la primera neurona de la vía afectada, sino en todas las estaciones de la vía afectada: tronco, tálamo y corteza.

La plasticidad inducida por desaferentización se ha mostrado, igualmente, en todos los sistemas sensoriales. Nuestro mayor interés es conocer los cambios plásticos que ocurren en el SNC de mamífero adulto tras la privación sensorial (o desaferentización) por lesión traumática de nervio periférico del sistema somatosensorial. Por esto, el capítulo se centrará en los antecedentes sobre lesiones severas de nervio/s periférico/s, sin posibilidad de reparación/reinervación natural o quirúrgica (para estudios sobre plasticidad inducida por lesiones en médula o núcleos del cordón posterior ver Wall et al., 2002). Al final del capítulo se expone, brevemente, algunos de los estudios sobre plasticidad inducida por desaferentización en otros sistemas sensoriales (visual y auditivo)

### 2.3.1. Plasticidad en el sistema somatosensorial

La plasticidad de los sistemas somatosensorial y motor tras lesión irreversible de nervio periférico o amputación ha sido extensamente estudiada y documentada en las

últimas tres décadas en humanos, primates no humanos, gatos, roedores e incluso en animales no mamíferos. A los primeros hallazgos sobre reorganizaciones funcionales en la corteza, han seguido estudios que demuestran plasticidad en otros sustratos subcorticales (Kaas et al., 1999; Negredo et al., 2009; Panetsos et al., 1995; Pettit and Schwark, 1993), así como cambios estructurales, moleculares y neuroquímicos tras la desaferentización.

En la década de los 80s, el grupo de Merzenich (Kaas et al., 1983; Merzenich et al., 1983a; Merzenich et al., 1983b; Wall et al., 1986) demostró que la sección crónica del nervio mediano (que inerva la piel de la palma de la mano y tres primeros dedos) provocaba una expansión de los mapas corticales de las áreas 3b y 1, pertenecientes a las aferencias del nervio radial intacto (que inerva la piel del dorso de la mano y los dedos). Estos cambios persistían más allá de los primeros días-semanas. Tras 2-5 meses desde la sección combinada de los nervios mediano y ulnar, también se mostró cómo los estímulos del nervio radial intacto activaban regiones del área cortical 3b, normalmente activadas por entradas desde la palma de la mano. Como resultado, la zona del área 3b dedicada al dorso de la mano, se expandía distancias de hasta 3,0-3,5 mm ocupando casi la totalidad del mapa cortical dedicado a la mano. Estudios posteriores con tiempos post-lesión más amplios, sugirieron que los cambios corticales crónicos se desarrollaban progresivamente en, al menos, dos fases: una fase temprana (primeros 1-2 meses) que provocaba la activación de áreas corticales por entradas nuevas del dorso de la mano, y una fase crónica subsiguiente (que ocurre durante el primer año) que resultaba en modificaciones adicionales. Estos cambios plásticos no se limitan a la corteza y, usando el mismo modelo experimental, se mostró que tras 2-5 meses desde la lesión combinada de los nervios mediano y ulnar los mapas del dorso de la mano también se expandían en el núcleo ventroposterior lateral (VPL; Garraghty and Kaas, 1991). Además estos cambios, tanto en VPL como en el área cortical 3b, implicaban la reactivación de los mapas de la palma de la mano denervada por aferencias de similares localizaciones en el dorso de la mano. Esto sugería que, de algún modo, los cambios en los mapas corticales podrían ser *re-expresiones* de los cambios en VPL. Estudios posteriores demostraron que, incluso en estaciones inferiores para el procesamiento de la información, y ante una desaferentización reversible inducida por anestesia local, las neuronas del núcleo gracilis de gato (Pettit and Schwark, 1993) y rata (Panetsos et al., 1995; Panetsos et al., 1997) respondían a la falta de entrada sensorial con respuestas potenciadas a los

estímulos aplicados alrededor del campo original, provocando la aparición de nuevos campos receptivos solapantes inmediatamente tras la desaferentización (Panetsos et al., 1995). Estos cambios, además, eran expresados por dos tipos distintos de neuronas en el núcleo gracilis, las de proyección talámica e interneuronas inhibitorias (Panetsos et al., 1997) y fueron registrados también a nivel cortical (Panetsos et al., 1995). Similares resultados se obtuvieron al estudiar el núcleo cuneatus, resgistrándose cambios funcionales tras minutos-horas desde la desaferentización (Xu and Wall, 1997).

El interés por comprender el origen de estas reorganizaciones llevó a estudiar posibles mecanismos inhibitorios o neuromoduladores subyacentes. Las pruebas realizadas tras 2-5 meses desde la sección de los nervios mediano y ulnar demostraron que el inmunomarcado celular para el GABA se había reducido en la capa IV y en otras capas del área 3b del mapa de la mano (Garraghty et al., 1991). Aunque la inhibición no se midió directamente, estos resultados sugerían una disminución en la inhibición intracortical que habría potenciado la capacidad de los estímulos del dorso de la mano desde VPL a activar mayores regiones del mapa cortical de la mano. La inmunorreactividad a taquinina también se reducía en las células de capa IV del área 3b 5-21 días después de la lesión, demostrando que los cambios electrofisiológicos iban acompañados por cambios neuroquímicos/moleculares durante los primeros días-meses (Cusick, 1991).

Otros estudios analizaron la contribución potencial de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas y mecanismos que implicaban a los receptores de NMDA. Tras sección al nervio mediano, la expansión del área 3b, correspondiente al mapa del dorso de la mano, se reducía cuando se aplicaba un antagonista del NMDA durante el primer mes tras la lesión, pero no se reducía cuando el antagonista se inyectaba después de este periodo (Garraghty and Muja, 1996; Myers et al., 2000). Estudios posteriores mostraron que un mes después de la lesión, la inmunorreactividad a glutamato permanecía cualitativamente normal en el asta dorsal, tronco, tálamo y SmI. Esto sugirió que la liberación normal de glutamato y quizá los mecanismos mediados por NMDA operan en las estructuras corticales y subcorticales durante el primer mes tras el daño, y que cualquiera o todas estas estructuras podrían ser localizaciones para los cambios mediados por el receptor NMDA. También se demostró que la lesión crónica de nervio periférico modifica la organización funcional espinal y que los receptores de NMDA contribuyen a estos cambios espinales durante las primeras dos semanas post-lesión.

De todos los sistemas somatosensoriales, el sistema vibrisas-*barriles* de roedor es probablemente el más utilizado en los estudios de plasticidad (Erzurumlu and Gaspar, 2012; Fox, 2002; Kossut, 1992a; Kossut and Juliano, 1999; Maier et al., 2003; Skibinska et al., 2000; Wallace and Fox, 1999; Welker et al., 1989). Una de las ventajas de este sistema es que las entradas periféricas pueden ser manipuladas fácilmente en una gran variedad de formas, para evaluar distintos aspectos de la plasticidad dependiente de actividad. Como ya hemos comentado en la sección precedente, la corteza de *barriles* es un mapa isomórfico y discreto de las entradas en las vibrisas. La forma en que los bigotes son manipulados en el rostro (eliminados o mantenidos, por ejemplo) se refleja en el esquema cortical (con *barriles* menos o más activos). La plasticidad en este sistema se ha estudiado ampliamente en el desarrollo, período crítico y adulto, utilizando paradigmas experimentales de todos los tipos: eliminación de una, varias o todas las vibrisas, lesiones por aplastamiento o seccionamiento del IoN, recorte (no eliminación completa) de los bigotes, etc.

Actualmente sabemos que la reorganización del SNC tras desaferentización crónica implica dos mecanismos principales que operan en distinto momento tras la lesión: cambios tempranos que suponen el desenmascaramiento de conexiones anatómicamente presentes pero funcionalmente inactivas, y cambios más tardíos o secundarios que cursan con la formación de nuevas conexiones.

La pérdida de inhibición en las primeras fases produce un aumento en el tamaño de los campos receptivos del mapa cortical de los territorios próximos a la representación cortical de la parte dañada. El desenmascaramiento de estas conexiones podría ser el resultado de cambios en neurotransmisores, receptores, o propiedades de conductancia de membrana que llevan a un aumento de la excitabilidad cortical (Kaas, 1991), pero la mayoría de ellos se deben a una reducción en la inhibición rápida del GABA sobre las sinapsis excitatorias. Las neuronas GABAérgicas constituyen aproximadamente un cuarto de la cantidad total de la población neural, y la principal clase de receptores de GABA está regulada por la actividad, incluso en los adultos (Jones, 1993). La reducción de las neuronas que contienen GABA y de la enzima sintetizante de GABA (glutamato descarboxilasa, GAD) en SmI es un hecho ampliamente demostrado tras desaferentización periférica (Welker et al., 1989).

En los siguientes periodos tras la lesión, otros mecanismos empiezan a actuar, como la LTP, con su aumento en la activación de los receptores NMDA y la LTD

(Buonomano and Merzenich, 1998). El bloqueo de receptores glutamatérgicos de NMDA reduce la reorganización cortical tras desaferentización periférica en gato y mono, apoyando la idea que la actividad glutamatérgica es necesaria para el remodelamiento cortical. El bloqueo de los receptores de NMDA podría evitar la reorganización impidiendo cambios en la fuerza de sinapsis existentes, interfiriendo con el crecimiento neurítico, o ambos.

En los casos de desaferentización crónica se propuso, ya en las fases pioneras de este tipo de investigaciones (Wall and Egger, 1971), que los cambios funcionales a largo plazo se podrían sustentar en reorganizaciones estructurales paralelas. Churchill y colaboradores demostraron recientemente cómo tras la misma lesión de los nervios mediano y ulnar que la realizada en los experimentos de Merzenich, las reorganizaciones topográficas iban acompañadas por alteraciones estructurales finas (Churchill et al., 2004). Estos autores mostraron cómo los árboles dendríticos de las capas corticales se expandían distalmente, mientras que permanecían sin cambios en las zonas proximales. Este hecho se mostró tanto para las dendritas basilar y apical de las neuronas espinosas estrelladas de capa IV (que reciben llegada directa talámica) como en las neuronas Pyr de las capas II/III, aunque la diferencia fue mayor para los árboles dendríticos basilares. Este remodelamiento podría ser un intento de mantener el nivel normal de la *ratio* señal-a-ruido y una expresión de la respuesta homeostática a la deprivación sensorial. También sugiere que los sectores distales del árbol dendrítico podrían estar selectivamente inervados por las aferencias latentes.

Un número de estudios han mostrado una regulación *al alza* de moléculas asociadas al crecimiento, como GAP-43 (*growth associated protein 43*), en las prolongaciones centrales de las neuronas ganglionares tras axotomía. Los receptores de neurotrofinas de alta afinidad, como trk (tropomiosina-receptor-quinasa) A y trkB, también están aumentados en las células gliales de la columna dorsal de la médula espinal tras sección de la raíz dorsal. Ciertas neurotrofinas, como el BDNF y el NGF también podrían estar afectando la somatotopía en la corteza de rata adulta tras lesiones periféricas.

Las neuronas sensoriales periféricas también se ven afectadas por la desaferentización: se producen ramificaciones aberrantes de las fibras y formación de neuromas, cromatolisis y pérdida de neuronas en los ganglios, atrofia y degeneración de las prolongaciones centrales de las neuronas sensoriales en tronco y astas de la médula espinal y cambios en el nivel de distintos neuropéptidos. Además de a nivel de neurona

sensorial primaria, la lesión nerviosa también puede causar la atrofia trans-sináptica de neuronas centrales. La mayoría de estos cambios ya son detectables dentro de las primeras semanas tras lesión (revisado en Wall et al., 2002).

### ***2.3.2. Plasticidad central inducida por desaferentización en otros sistemas sensoriales***

#### **SISTEMA VISUAL**

Uno de los sistemas que más ha permitido conocer la plasticidad cortical ha sido el sistema visual. Se han escrito volúmenes enteros sobre plasticidad inducida por privación sensorial en este sistema, cuyo resumen sería siempre una infravaloración y explicarlos en profundidad sobrepasaría los límites de esta Tesis (para una revisión actualizada sobre el tema ver Gilbert and Li, 2012). Aquí, exponemos brevemente sólo algunos de los hallazgos más interesantes desde el punto de vista anatomofuncional.

Estudios pioneros en este sistema llevaron a establecer que las propiedades de los campos receptivos dependen de la experiencia (Wiesel and Hubel, 1965), que las vías aferentes compiten para los territorios corticales durante el desarrollo (Hubel et al., 1977), y que la plasticidad exhibe un período crítico, donde los cambios son más drásticos que en la edad adulta (Hubel and Wiesel, 1970). Desde los trabajos clásicos de Hubel and Wiesel en la década de los 70s, donde demostraron la influencia de la experiencia visual sobre las columnas de dominancia ocular (Hubel and Wiesel, 1962), muchos estudios han tratado de determinar cómo la experiencia modeliza la arquitectura y conectividad neuronal para determinar los cambios en su fisiología y comportamiento. El papel de la experiencia visual se ha estudiado típicamente manteniendo en oscuridad a los animales, o privando uno (deprivación monocular, DM) o ambos (deprivación binocular) ojos. Los primeros estudios que demostraron cambios plásticos estructurales fueron llevados a cabo por Valverde y Ruiz Marcos. Estos autores demostraron cómo la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa cortical V de corteza visual primaria (V1) disminuía por una falta de estimulación sensorial en la vía intacta (Ruiz-Marcos and Valverde, 1969; Ruiz-Marcos and Valverde, 1970; Valverde and Ruiz-Marcos, 1969). Más recientemente se ha demostrado una pérdida rápida y significativa de espinas en las dendritas apical y basal de las neuronas piramidales de capa III de V1 tan sólo 4 días desde la DM en ratón (Mataga et al., 2004). La DM en rata también causa una pérdida de espinas así como cambios en la morfología de las dendritas basales en las células de capa III (Wallace and Bear, 2004).

Usando registros crónicos in vivo y potenciales visuales evocados, se ha demostrado cómo la DM durante un período de 5 días causa alteraciones en la dominancia ocular en animales de edad avanzada, hasta en P90. Estos cambios podrían deberse a la potenciación del ojo no lesionado. El periodo de deprivación es importante porque la potenciación de las llegadas desde el ojo abierto ocurre más lentamente que la depresión de las del ojo cerrado (Frenkel and Bear, 2004). Como en todos los sistemas sensoriales, la plasticidad en el sistema visual adulto no niega la existencia de cambios más drásticos durante el período crítico. De hecho, en V1 los cambios en la dominancia ocular en respuesta a la DM hasta P23 son más significativos que los detectados a partir de P30 (Sawtell et al., 2003). La diferencia entre la plasticidad visual en el período crítico y en la edad adulta (como ocurre en prácticamente todos los sistemas sensoriales) es que en desarrollo los cambios no sólo se deben a la potenciación de las aferencias del ojo abierto, sino que dependen críticamente de la depresión de aquellas que vienen del ojo cerrado. Sólo las alteraciones en la entrada visual durante el período crítico pueden llevar a una disminución en la respuesta cuando el ojo es re-abierto (revisado en Fox and Wong, 2005).

## SISTEMA AUDITIVO

El estudio de la plasticidad en el sistema auditivo resulta especialmente interesante puesto que, en la actualidad, las únicas neuroprótesis realmente funcionales son las cocleares. Desde principios de 1980s, muchas investigaciones se centran en los efectos de la privación auditiva sobre la estructura y función de los núcleos centrales. Una característica común a todos los sistemas es que el hecho de que el SNC adulto sea plástico no significa que exista un período crítico en el desarrollo donde las consecuencias de la privación sensorial son más pronunciadas. Esto también ocurre en el sistema auditivo (Hardie and Shepherd, 1999; Nordeen et al., 1983). En la mayoría de estudios, la privación se origina por lesión en la cóclea (química o mecánica), tanto en edad temprana como en animales adultos. La desaferentización produce una cascada de eventos patológicos y atróficos que se inician en el órgano periférico (Terayama et al., 1977), siguen con la degeneración retrógrada del nervio auditivo (Irving et al., 2013; Otte et al., 1978) y alcanzan los núcleos del sistema auditivo central (para una revisión extensa, ver Shepherd and Hardie, 2001).



No todos los cambios en las propiedades de respuesta y organización neural detectados tras la alteración de la entrada periférica reflejan remodelamientos plásticos. Algunos cambios son consecuencia directa o pasiva de la desaferentización. Por ejemplo, la destrucción de las células pilosas externas provoca cambios inmediatos en la sintonización de las frecuencias en las fibras del nervio auditivo. Estos cambios son una consecuencia directa de la eliminación del amplificador coclear, más que una reorganización activa (Fettiplace and Hackney, 2006). Los fenómenos plásticos implican siempre algún tipo de modificación dinámica o activa de las propiedades neurales, que se dispara por los cambios en la entrada periférica. Una lesión mecánica que daña la región basal de la cóclea elimina la salida de la cóclea por encima de un rango restringido de altas frecuencias, produciendo sordera en el oído para estas frecuencias. Si se examina la corteza auditiva primaria (AI) contralateral algunas semanas después de la lesión, la región correspondiente a las altas frecuencias no está silente, sino que ha sido ocupada por una expansión de las representaciones de las frecuencias adyacentes perilesionales (Irvine et al., 2006). Este tipo de plasticidad en AI también se ha observado en el principal núcleo talámico auditivo (la división ventral del núcleo geniculado medial) tras lesiones mecánicas cocleares unilaterales en gato adulto (Kamke et al., 2003).

## 2.4. NEUROESTIMULACIÓN Y PLASTICIDAD

La historia moderna del uso clínico de la neuroestimulación periférica comenzó con la estimulación de un nervio periférico en la década de los 60s, cuando White y Sweet implantaron electrodos para tratar un síndrome de dolor regional complejo. Durante el mismo año, Melzack y Wall publicaron su teoría sobre el *control de la puerta de entrada del dolor*, o teoría de la compuerta, que postulaba que activando la mecanocepción con estímulos inocuos era posible suprimir la transmisión del dolor (revisado en Rasskazoff and Slavin, 2012). Desde entonces, la neuromodulación por estimulación periférica incluye distintas técnicas. Todas las técnicas siguientes son sistemas que integran interfaces neurales. En este sentido, también pueden ser consideradas BMIs (interfaces cerebro-máquina). Las diferenciamos de las neuroprótesis (capítulo 2.5. *Desaferentización, Neuroprótesis y Plasticidad*) puesto que éstas últimas están más dirigidas a reemplazar una función sensorimotora perdida por desaferentización (por ejemplo, tras amputación o los implantes cocleares).

La neuroestimulación periférica ha sido aplicada tradicionalmente sobre nervios periféricos no seccionados. Aparte de los cambios que ocurren localmente en el músculo y médula espinal, las investigaciones más recientes demuestran que la ES periférica induce plasticidad cortical (revisado en Chipchase et al., 2011). Por ejemplo, el aumento de la entrada periférica mediante ES repetitiva de un nervio periférico lleva a aumentos o descensos en la respuesta cerebral a la estimulación magnética transcraneal (Ridding et al., 2001). La estimulación somatosensorial, aplicada con un guante sobre toda una mano en sujetos sanos, aumenta el nivel de oxigenación sanguíneo dependiente de actividad en las áreas sensorimotoras bilaterales. Estos cambios persisten durante, al menos, 60 min tras el fin del periodo de estimulación (Golaszewski et al., 2004). Estos hallazgos para sujetos saludables son consistentes con resultados de otros estudios que muestran una mejora de la función motora tras periodos de estimulación somatosensorial de la mano parética en pacientes con ACV crónico (Wu et al., 2006).

En la mayoría de estudios que evalúan la plasticidad cortical por ES periférica, utilizan los cambios en la amplitud de los potenciales motores evocados (PME) como parámetro de medida. Estos PMEs reflejan la excitabilidad de la vía corticomotora al completo, lo que dificulta determinar los sustratos estructurales (corticales o subcorticales) para tales cambios. Un estudio realizado en 2002 demostró que la administración de Lorazepam (un agonista de receptores GABAérgicos) bloquea los efectos facilitadores de la ES aplicada al nervio ulnar, mientras que la administración de dextrometorfano (antagonista de los receptores NMDA) no provoca ningún efecto (Kaelin-Lang et al., 2002). Estos resultados apoyan el papel de la inhibición GABAérgica como posible mecanismo para la facilitación de la respuesta tras ES periférica.

## 2.5. DESAFERENTIZACIÓN, NEUROPRÓTESIS Y PLASTICIDAD

En este capítulo revisamos los conocimientos que existen hasta nuestros días sobre la tecnología que incluye interfaces neurales, y que está destinada a reemplazar funciones sensorimotoras perdidas por desaferentización, en relación a la plasticidad del SN. Nos referimos a este tipo de tecnología como prótesis neurales, neuroprótesis o bajo el concepto más genérico de sistemas BMIs. Sin embargo, no hay que olvidar que todas

las distintas herramientas de neuroestimulación expuestas en el capítulo anterior (2.4. *Neuroestimulación y Plasticidad*), y dirigidas fundamentalmente a la rehabilitación y/o modulación de la excitabilidad del SN, pueden considerarse también sistemas BMIs.

### **2.5.1. Neuroprótesis Sensoriales Funcionales. Implantes Cocleares**

Al hablar de neuroprótesis sensoriales, resulta necesario mencionar los implantes cocleares (IC). Estos sistemas son realmente las únicas neuroprótesis completamente funcionales en la actualidad. La FDA (Administración de los Estados Unidos para los Alimentos y los Fármacos) aprobó su uso para tratar la pérdida de audición en 1984 y, desde entonces, se han producido grandes avances en la comprensión de los mecanismos biológicos que subyacen a su eficacia (para una revisión extensa, ver Fallon et al., 2008).

Desde principios de 1980s, muchas investigaciones se centran en los efectos de la privación auditiva sobre la estructura y función de los núcleos centrales. Una característica común a todos los sistemas es que el hecho de que el SNC adulto sea plástico no significa que exista un período crítico en el desarrollo donde las consecuencias de la privación sensorial son más pronunciadas. Esto también ocurre en el sistema auditivo (Hardie and Shepherd, 1999; Nordeen et al., 1983). En la mayoría de estudios, la privación se origina por lesión en la cóclea (química o mecánica), tanto en edad temprana como en animales adultos. La desaferentización produce una cascada de eventos patológicos y atróficos que se inician en el órgano periférico (Terayama et al., 1977), siguen con la degeneración retrógrada del nervio auditivo (Irving et al., 2013; Otte et al., 1978) y alcanzan los núcleos del sistema auditivo central (para una revisión extensa, ver Shepherd and Hardie, 2001).

No todos los cambios en las propiedades de respuesta y organización neural detectados tras la alteración de la entrada periférica reflejan remodelamientos plásticos. Algunos cambios son consecuencia directa o pasiva de la desaferentización. Por ejemplo, la destrucción de las células pilosas externas provoca cambios inmediatos en la sintonización de las frecuencias en las fibras del nervio auditivo. Estos cambios son una consecuencia directa de la eliminación del amplificador coclear, más que una reorganización activa (Fettiplace and Hackney, 2006). Los fenómenos plásticos implican siempre algún tipo de modificación dinámica o activa de las propiedades

neurales, que se dispara por los cambios en la entrada periférica. Una lesión mecánica que daña la región basal de la cóclea elimina la salida de la cóclea por encima de un rango restringido de altas frecuencias, produciendo sordera en el oído para estas frecuencias. Si se examina la corteza auditiva primaria (AI) contralateral algunas semanas después de la lesión, la región correspondiente a las altas frecuencias no está silente, sino que ha sido ocupada por una expansión de las representaciones de las frecuencias adyacentes perilesionales (Irvine et al., 2006). Este tipo de plasticidad en AI también se ha observado en el principal núcleo talámico auditivo (la división ventral del núcleo geniculado medial) tras lesiones mecánicas cocleares unilaterales en gato adulto (Kamke et al., 2003).

A nivel celular, cuando la desaferentización no es congénita, se ha demostrado que la reactivación del nervio auditivo silenciado, mediante la estimulación del IC, puede evitar o disminuir los eventos estructurales atróficos inducidos por la privación sensorial (Hardie, 1998). Distintos trabajos *in vitro* han demostrado que la despolarización *per se* es una potente fuente de apoyo neurotrófico a las células del ganglio espiral (CGS; Miller et al., 2003). La supervivencia de las CGS ha sido considerada tradicionalmente el blanco para la acción de la ES (Shepherd et al., 2008), con tasas de supervivencia tras ES de hasta un 70% más en animales estimulados respecto a no estimulados. Además, la neuroestimulación podría potenciar la supervivencia de las CGS a través de la expresión aumentada de factores neurotróficos, como el BDNF. Algunos cambios estructurales bien documentados tras la neuroestimulación de los IC muestran cómo el aumento de la actividad presináptica conlleva a una recuperación del área del soma (Matsushima et al., 1991) y del estatus metabólico de las neuronas de los núcleos centrales auditivos (Schwartz et al., 1993; Wong-Riley et al., 1981).

A nivel funcional, el sustrato neural de los IC es la organización tonotópica de la membrana basal y el nervio auditivo. Los electrodos de estimulación se insertan a lo largo del nervio auditivo para provocar actividades neurales que representan las diferentes frecuencias del sonido. La neuroplasticidad tiene un papel clave, como lo demuestra que incluso los IC más avanzados actualmente en el mercado sólo tienen 16 electrodos para representar un limitado número de frecuencias. La plasticidad inducida por el uso/entrenamiento, especialmente si el implante se hace en la infancia, permite a los usuarios aprender a discriminar varios sonidos, comprender el lenguaje e, incluso, disfrutar de la música (Sharma et al., 2009).

### 2.5.2. Neuroprótesis en Amputación

Durante miles de años las personas con amputaciones traumáticas de miembro han tratado de compensar sus deficiencias funcionales y cosméticas con prótesis. Las prótesis cosméticas eran ya utilizadas por los egipcios, y sistemas de tipo protésico, específicamente concebidos para la restauración funcional, fueron descritos durante principios del siglo XVI (revisado en Di Pino et al., 2009).

El nivel de complejidad y finura de una prótesis para la extremidad superior/mano/dedos es remarcadamente más complejo que para la extremidad inferior. Este problema no ha sido resuelto con las intervenciones de transplante, que no parecen representar una solución aceptable y disponible, al menos para la población a gran escala. A pesar del enorme número de innovaciones en ciencia y tecnología en los últimos cinco siglos, varias barreras continúan haciendo imposible la aplicación exitosa de sistemas protésicos de alta tecnología para resolver el problema de las prótesis de mano. Las prótesis de mano más avanzadas en la actualidad, comercialmente disponibles, son poco más que tenazas unidimensionales, con pocos o ningún sensor y, por tanto, prácticamente operan bajo control visual. Esto determina que la gran mayoría de amputados sólo usan, cuando lo hacen, prótesis cosméticas. La aceptabilidad general de una prótesis depende de múltiples factores, como destreza, antropomorfismo, propiedades de control, autonomía de operación o dependencia, pero fundamentalmente, del tipo de interfaz y de la calidad y cantidad de información sensorial que es capaz de transmitir al usuario (Posteraro et al., 2010). De los últimos puntos, la transferencia de información y la latencia (es decir, el tiempo que pasa entre comando y acción), ambos aportados por la interfaz, son los que tienen un papel más importante.

Laboratorios de todos los lugares del mundo están trabajando para superar estos obstáculos y desarrollar una nueva generación de neuroprótesis funcional. Las tecnologías robóticas modernas, como los métodos de diseño mecatrónicos, los sensores de micro-posición y de fuerza/tacto, están permitiendo el desarrollo de prótesis de mano compactas, de bajo peso, y con múltiples dedos con controladores insertados que permiten un control activo del agarre y podrían realizar tareas de destreza manipulativa, si se conectaran adecuadamente con el SN del individuo. Idealmente una interfaz cerebro-máquina, o BMI, lleva implementado un control de bucle cerrado de las prótesis mecatrónicas con intercambio bidireccional (aferente y eferente) de información con el SN del amputado. Un ejemplo de este tipo de aplicación es el sistema *CyberHand*, una

mano antropomórfica cibernética específicamente diseñada para ser conectada a través de una interfaz neural bidireccional al SNC y SNP, lo que, se supone, permitirá el intercambio de señales aferentes y eferentes con el usuario (Carrozza et al., 2006). Otra importante iniciativa de investigación que apoya el desarrollo e innovación de prótesis de mano funcionales es el proyecto *Revolutionizing*, financiado por la DARPA (Agencia de Proyectos de Investigación de Defensa de EEUU). Recientemente, se ha publicado un trabajo, resultado de la plataforma europea *Lifehand 2*, con resultados muy esperanzadores para el avance de las BMIs. Este trabajo muestra cómo un hombre que perdió la mano izquierda hace nueve años es capaz de sentir diferentes tipos de presión sobre tres dedos de una mano robótica protésica (Raspopovic et al., 2014). En el estudio se ha usado un nuevo tipo de dispositivo implantado que proporciona información directamente a los nervios remanentes del brazo. Los electrodos se insertaron en dos de los tres principales nervios del brazo del paciente: el cubital y el mediano. Cuando se detecta fuerza en las yemas de los dedos de la mano artificial, ésta se convierte en estímulos eléctricos que van hasta los electrodos. La estimulación del nervio cubital produjo sensaciones en el meñique, mientras que la estimulación del nervio mediano produjo sensaciones en los dedos índice y pulgar. Los autores, además, fueron capaces de ajustar los niveles de estimulación para que se correspondieran con la cantidad de presión aplicada a un dedo, produciendo sensaciones que van desde el toque más ligero a una presión mayor. El implante se colocó durante 31 días. Este trabajo podría suponer el primer amputado en el mundo en lograr sensaciones, en tiempo real, con una prótesis sensorial mejorada. Cuando se establezca el rendimiento a largo plazo de esta nueva interfaz neural, este enfoque podría mejorar significativamente la calidad de vida de los amputados.

Actualmente, y a pesar de los avances, una de las mayores necesidades que sigue sin resolverse es la potenciación de las entradas extero- y propio-ceptivas que la neuroprótesis es capaz de transmitir al paciente, de una forma relativamente fisiológica, para reemplazar las sensaciones naturales y re-obtener plena consciencia del miembro perdido, *incluyéndolo de nuevo en el esquema corporal*. Considerando todo lo expuesto hasta ahora en esta sección de Antecedentes (desde la reorganización tras desaferentización a la plasticidad inducida por neuroestimulación), una contribución fundamental a la investigación y búsqueda de especificaciones funcionales y técnicas para las neuroprótesis avanzadas, así como para las BMIs en general, podría llegar del

análisis profundo y sistemático de lo que hay en el otro lado de la interfaz: el sistema nervioso del amputado. A falta de investigaciones en modelos animales enfocadas a detectar y evaluar, morfológica, neuroquímica, funcional, o comportamentalmente, los efectos del uso de BMIs sobre la reorganización neuroplástica, los datos que disponemos en la actualidad vienen en su mayoría de estudios en amputados humanos que han usado a largo plazo prótesis funcionales. De los estudios de prótesis crónicas, se deduce fundamentalmente que la frecuencia y el tipo de prótesis usada por el amputado está directamente correlacionada con la presencia y cantidad de reorganización cortical y de la existencia del dolor por miembro fantasma\* (PLP, por sus siglas en inglés *Phantom Limb Pain*). En un estudio de fMRI con amputados a largo plazo, tanto la reorganización cortical motora y sensitiva como el PLP se correlacionaban negativamente con el uso extensivo de prótesis controladas mioeléctricamente (Lotze et al., 1999). Además, una media de 9 años de uso de una prótesis, que opera a través del cabo muscular amputado, permite un aumento en la utilización del miembro afectado, llevando a una reducción en el PLP, mientras que esto no ocurre con las prótesis cosméticas (Weiss et al., 1999). Similares resultados se han observado con los potenciales corticales relacionados con el movimiento (Karl et al., 2004) y se ha sugerido que el entrenamiento de los cabos musculares combinado con la retroalimentación visual, ambos necesarios para el uso de neuroprótesis, reemplaza la pérdida de la entrada periférica al área cortical somatosensorial responsable para la mano perdida, reduciendo así la cantidad de reorganización en SmI y también en las áreas motoras. Tales consideraciones apoyan la idea que la reducción en la reorganización cortical descrita tras entrenamiento sensorial discriminatorio en amputados se debe a la amplificación de las entradas desde la periferia (Flor et al., 2001). De todos estos hallazgos, se puede inferir que el uso diario y continuado de una prótesis que es capaz de aportar una cantidad (cercana a la fisiológica) de estímulos sensoriales extero- y propio-ceptivos a través de su interfaz, tendrá también efectos a largo plazo en la reducción del PLP. Esta reducción incluso podría mejorarse si las interfaces neurales que controlan la prótesis son implantadas en los nervios lesionados que tenían como función original llevar la sensación y moción para la mano perdida (nervios ulnar, mediano y radial, por ejemplo). Esta estrategia podría facilitar el aumento en las entradas periféricas dirigidas a las áreas cerebrales de mano/antebrazo, que son los principales lugares afectados por la plasticidad aberrante.

\*Dolor por miembro fantasma (PLP): El PLP es un dolor causado por la eliminación o destrucción de los impulsos nerviosos sensoriales al destruirse o dañarse las fibras nerviosas sensoriales tras amputación o desaferentización (para una revisión extensa sobre el tema, ver Wolff et al., 2011).





## **II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS y DISEÑO**

---



## HIPÓTESIS, OBJETIVOS y DISEÑO

---

### 1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 1.1. HIPÓTESIS

La **Hipótesis de trabajo primaria** de la presente Tesis es:

*“La estimulación neuroprotésica de un nervio periférico sensitivo irreversiblemente seccionado puede alterar la plasticidad dependiente de la entrada sensorial que se manifiesta en las vías y centros afectados por la desaferentización”*

De ella podría derivarse una **Hipótesis secundaria**, que propondría que:

- *tales alteraciones de la plasticidad alcanzarán niveles de expresión anatómica y funcional detectables y cuantificables en la corteza somatosensorial primaria desaferentizada,*
- *y que las estructuras subcorticales de la vía desaferentizada también podrían verse afectadas, contribuyendo activamente a los fenómenos de reorganización cortical.*

#### 1.2. OBJETIVOS

Para verificar las hipótesis arriba mencionadas nos planteamos los siguientes **Objetivos**:

1. Detectar y cuantificar los efectos de la amputación de un nervio periférico sensitivo sobre las características anatomofuncionales de la corteza somatosensorial primaria. De forma específica, evaluar si la amputación de nervio periférico modifica:
  - 1.1 la actividad metabólica cortical
  - 1.2 el volumen del neuropilo cortical
  - 1.3 los circuitos inhibitorios corticales
  - 1.4 la innervación colinérgica cortical
  - 1.5 la actividad funcional cortical

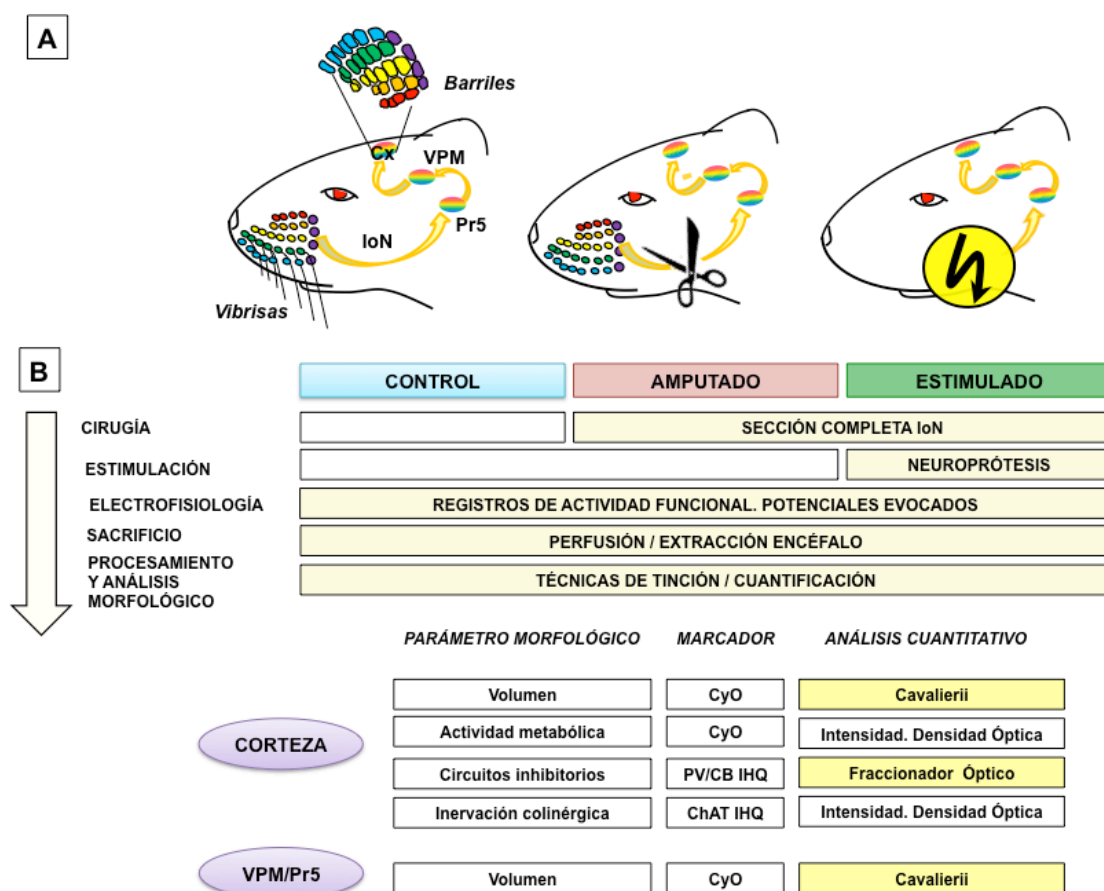
2. Detectar y cuantificar los efectos de la estimulación neuroprotésica del nervio periférico sensitivo amputado sobre las características anatomofuncionales de la corteza somatosensorial primaria desaferentizada. De forma específica, evaluar si la estimulación neuroprotésica del nervio periférico amputado evita/modifica las consecuencias de la desaferentización sobre:
  - 2.1 la actividad metabólica cortical
  - 2.2 el volumen del neuropilo cortical
  - 2.3 los circuitos inhibitorios corticales
  - 2.4 la innervación colinérgica cortical
  - 2.5 la actividad funcional cortical
3. Evaluar cuantitativamente la posible contribución de las estructuras subcorticales en los procesos corticales arriba mencionados. De forma específica, evaluar si las manipulaciones periféricas tienen algún efecto sobre:
  - 3.1 el volumen del neuropilo del núcleo ventral postero-medial, en tálamo
  - 3.2 el volumen del neuropilo del núcleo principal del trigémino, en tronco

## **2. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Para alcanzar nuestros objetivos, diseñamos un modelo experimental en rata que reprodujera las condiciones de Amputación y subsiguiente Estimulación Neuroprotésica y que permitiera comparar morfológica y electrofisiológicamente el efecto de la estimulación sobre la reorganización plástica de la corteza desaferentizada. El diseño experimental se basó en comparaciones anatomofuncionales de la vía vi brisas-*barriles* intacta (C), completamente desaferentizada (A) y completamente desaferentizada pero sometida a estimulación artificial inmediata tras la lesión (Fig. 3B).

En este marco se eligieron unos parámetros anatómicos y funcionales representativos de los fenómenos de plasticidad cortical dependiente de actividad. Las variables elegidas en este estudio fueron: *actividad metabólica*, *volumen*, *circuitos inhibitorios* e *innervación colinérgica* (para estudios morfológicos), y *actividad funcional cortical* (para estudios electrofisiológicos). Los parámetros anatómicos fueron evaluados

utilizando marcadores moleculares/electrofisiológicos específicos y técnicas bien establecidas (Fig. 3B).



**Fig. 3. Diseño y Desarrollo Experimental.** A) Grupos Experimentales Representación del fundamento de las condiciones experimentales desarrolladas para poder evaluar los efectos de la estimulación neuroprotésica sobre la plasticidad de la corteza desaferentizada: Control (izquierda, nervio periférico intacto), Amputación (centro, nervio periférico con sección irreversible) y Estimulación (derecha, nervio periférico con sección irreversible sometido a estimulación artificial). En el esquema de la situación Control, se indica gráficamente la vía somatosensorial elegida para la desaferentización crónica: el sistema trigeminal de vibrisas-*barriles*. La alta organización somatotópica de la vía determina que cada vibrisa del hocico del animal esté representada en los centros superiores por unidades morfológicas discretas, fácilmente identificables. Estas unidades en el caso de la corteza somatosensorial reciben el nombre de *barriles*. B) Esquema gráfico con el desarrollo de la experimentación. En detalle se indican los parámetros morfológicos, marcadores moleculares y técnicas de recuento aplicadas en cada estructura o núcleo de la vía trigeminal. Los recuadros sombreados en amarillo indican técnicas estereológicas.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---





## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. MATERIALES

#### 1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los experimentos se realizaron exclusivamente en ratas hembras adultas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), adquiridas tanto en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), como en la empresa Harlan® (Harlan® Laboratories, Barcelona, España).

Las ratas pesaron 170-190 gramos a su llegada al estabulario, y se mantuvieron en grupos de tres animales por jaula. El estabulario o macroambiente de estabulación de los animales consistió en una habitación de 20 m<sup>2</sup> aproximadamente, situada en los laboratorios que el Grupo de Investigación de Neurocomputación y Neurorrobótica dispone en la Facultad de Óptica y Optometría de la UCM. La ubicación de la misma fue elegida para limitar la presencia de ruidos y/o trabajo de rutina del personal. La temperatura del habitáculo estuvo controlada por sistemas de aire acondicionado provistos de termostato, y fue mantenida constante a  $22 \pm 2$  °C. La humedad relativa del 55% fue asegurada mediante el empleo de humidificadores dotados igualmente de sensores para el mantenimiento del valor programado. Los animales estuvieron sujetos a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas no invertido (con el comienzo de la fase de luz a las 07:00 horas de la mañana), conseguido mediante lámparas programadas. La comida y agua durante todo el periodo de experimentación fueron de libre acceso 24 h/día. La alimentación consistió de una dieta sólida de pienso compuesto. El agua se administró de forma automática por succión de los biberones.

En total fueron utilizados 60 animales (incluido un 20% de bajas totales). Los animales de cada caja se distribuyeron respectivamente y al azar en tres grupos experimentales.

##### 1.1.1. Grupos experimentales

Se establecieron tres grupos experimentales (Fig. 3A) en función de las manipulaciones sobre el nervio infraorbitario: **Grupo Control** (C, n=15). Animales intactos, sin manipulación de IoN y mantenidos cuatro semanas en condiciones estándar

de laboratorio. **Grupo Amputación** (A, n=20) y **Grupo Estimulación** (S, n=20). Animales sometidos a sección completa e irreversible del IoN izquierdo, e inserción inmediata del cabo proximal en un implante con electrodos. Sólo los animales del grupo S recibieron corriente eléctrica continua a través de los electrodos (12h/día) durante cuatro semanas consecutivas, hasta el momento del sacrificio.

En el momento de la intervención (amputación de nervio e implantación de estimulador sin/con conexión a la fuente de alimentación según grupo A o S, respectivamente) los animales tenían cuatro meses de edad y un peso aproximado de 250 g.

Todos los procedimientos (cirugías, tratamiento postoperatorio, etc.) y condiciones experimentales (sujeción de animales, características de alojamiento, etc.) fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la UCM, siguiendo la legislación nacional (RD 1201/2005) y la Directiva de la UE (86/609/CE) vigentes en cada momento sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos.

### ***1.1.2. Tamaño de la muestra***

El tamaño óptimo de la muestra fue estimado considerando datos previos de trabajos de experimentación similar (Machin et al., 2004), así como la necesidad de reducir al mínimo el número de animales, de acuerdo con el principio de las 3R (reemplazamiento, reducción y refinamiento). Teniendo en cuenta que los objetivos de nuestra investigación no se pueden separar de la utilización de modelos animales -reemplazamiento-, los aspectos que consideramos afectaron fundamentalmente al REFINAMIENTO, que se consigue mediante la optimización de las habilidades y conocimientos experimentales, y a la REDUCCIÓN, utilizando el menor número posible de animales en cada ensayo que permita la validación estadística de los resultados, como se muestra en la obra original de los promotores de las 3R ((Russell, 1959); revisado en Ferdowsian and Beck, 2011).

Sobre la base de estas hipótesis (unido a la literatura del campo), el tamaño óptimo de cada grupo experimental es 10-15 animales (Machin et al., 2004; Mowery et al., 2009). Nosotros utilizamos una n muestral de 15 (grupo C) y 20 animales (grupos A y S), respectivamente. El tamaño muestral de nuestro estudio es ligeramente mayor debido al volumen de parámetros analizados. Este tamaño muestral es suficiente para los procedimientos experimentales llevadas a cabo en las cepas convencionales de rata

(Wistar) y dirigida a la definición/cuantificación de eventos neuronales específicos, como actividad metabólica o inmunoexpresión proteica.

## 1.2. MATERIAL DE LABORATORIO HISTOLÓGICO

En este apartado se indica el material fungible de laboratorio (junto con la casa comercial y referencia) utilizado en las técnicas generales de procesamiento tisular y tinción histológica (Tabla 1), así como las características de los anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica (Tabla 2).

### 1.2.1. Reactivos generales. Tinciones e histoquímica

**Tabla 1. Material de Laboratorio de Histología**

Nombre completo	Fórmula química/Pm	Nombre/Abrev en texto	Casa Comercial	Referencia
3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorada	$C_{12}H_{14}N_4 \times 4HCl$	DAB	Sigma Aldrich	D5637-10G
$\alpha$ -glucopranosil-b-fructofuranósido	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sacarosa	Panreac	141621.1211
ABC Vectastain (Kit) *IHQ		Kit ABC comercial	Vector Laboratories (ATOM)	PK 4000
Acetato sódico anhidro	$CH_3COONa$	Acetato sódico	Panreac	141633.1210
Ácido Acético glacial	$CH_3COOH$	Ácido Acético glacial	Panreac	211008.1211
Ácido hidroclorehídrico 37%	HCl	HCl	Panreac	141020.1611
Albúmina de Suero Bovino		BSA	Sigma-Aldrich	A7906
Azida Sódica 99%	$NaN_3$	Azida	Panreac	162712.1608
Bloqueo Avidina/Biotina (Kit) *IHQ		Kit avidina/biotina comercial	Vector Laboratories (ATOM)	SP 2001

Citocromo C * HQ	Pm: 12,384 g/mol	CyO	Sigma- Aldrich	C77526-500 mg
Citrato Trisódico Dihidrato	$C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	Citrato tri-sódico	Alfa Aesar	A12274
Cloroformo (estabilizado con etanol purísimo)	$Cl_3CH$	Cloroformo	Merck	113359
Cloruro Sódico	NaCl	Suero salino o fisiológico	Panreac	241659.1608
Etanol absoluto	$CH_3CH_2OH$	Alcohol 100°	Panreac	141086.1214
EtilénGlicol	$CH_2OHCH_2OH$	EtilénGlicol	Panreac	121316.1212
Fosfato sódico dibásico	$Na_2H_2PO_4 \times H_2O$	PB solución A	Sigma Aldrich	S9638-500G
Fosfato sódico monobásico	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	PB solución B	Sigma Aldrich	P3786-1KG
Gelatina		Gelatina	Sigma Aldrich	G2500-100g
Glicerol	$C_3H_8O_3$	Glicerol	Panreac	141339.1211
Hidróxido sódico 1 N	NaOH	NaOH	Panreac	181691.1211
Medio de montaje transparente DePeX®		DePeX	Serva	44581- 500ML
Paraformaldehído	$HO(CH_2O)nH$	PAF	Sigma- Aldrich	15812-7
Peróxido de Hidrógeno 30% en sol. acuosa	$H_2O_2$	$H_2O_2$	Sigma	H1009
Suero Normal de Burro *IHQ		DNS	Millipore	566460-5ML
Suero Normal de Cabra *IHQ		GNS	Millipore	NS02L-1ML
Suero Normal de Conejo *IHQ		RNS	Millipore	NS01L-1ML
Sulfato crómico potásico	$CrK(SO_4)_2 \times 12 H_2O$	Alumbre de Cromo	Fisher	243361
Tissue-Tek® O.C.T™		Tissue-Tek	Sakura	1013200019

Tris(hidroximetil)aminometano	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	Tris	Merck	1.08382.0500
Triton® X-100		Tx	Merck	1.08603.1000
Violeta de cresilo (acetato) *Tinción clásica	$\text{C}_{17}\text{H}_4\text{ClN}_3\text{N}$	Cristal violeta	VWR	83860.120
Xileno	$\text{C}_8\text{H}_{10}$	Xileno/xilol	Panreac	131769.1611

**Tabla 1.** Principales reactivos utilizados en el desarrollo experimental. Los reactivos o componentes específicos de algún procedimiento se indican con un asterisco (\*) seguido de las siglas de la técnica morfológica.

### 1.2.2. Anticuerpos empleados en Técnicas de Inmunomarcado.

**Tabla 2.** Anticuerpos

	Antígeno (Abreviatura)	Anticuerpo (Huésped)	Casa Comercial	Ref.
<b>PRIMARIOS</b>	Parvalbúmina (PV)	Mouse Anti-PV	Sigma Aldrich	P3088-2 ML
	Calbindina-D28k (CB)	Rabbit Anti-CB	Swant	300
	Colina acetil-transferasa (ChAT)	Goat Anti-ChAT	Millipore	AB144P
<b>SECUNDARIOS</b>  BIOTINA	Inmunoglobulina de Ratón (H+L)	Biotin-SP-Donkey Anti- Mouse IgG	Jackson Immunoresearch	715-065- 150
	Inmunoglobulina de Cabra (H+L)	Biotin-SP-Rabbit Anti- Goat	Jackson Immunoresearch	305-065- 003
	Inmunoglobulina de Conejo (H+L)	Biotin-SP-Donkey Anti Rabbit	Jackson Immunoresearch	711-065- 152

**Tabla 2.** Nombre completo y referencias comerciales de los anticuerpos utilizados en las técnicas de IHQ e IF.

### 1.3. MATERIAL DE LABORATORIO ELECTROFISIOLÓGICO

En este apartado se indica el material de laboratorio (junto con la casa comercial y referencia) utilizado en el estudio electrofisiológico (Tabla 3), así como las características técnicas de los componentes del estimulador neuroprotésico (Tabla 4).

#### 1.3.1. Material para Registros Electrofisiológicos

**Tabla 3. Material de Laboratorio de Electrofisiología**

<b>Nombre (función)</b>	<b>Tipo/Característica/Serie</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Ref.</b>
Microelectrodo de tungsteno (registro de PE en Sml)	3 $\mu\text{m}$ con recubrimiento 2.0 M $\Omega$ 1-2 $\mu\text{m}$ de punta Bipolar con distancia entre polos de 500 $\mu\text{m}$	World Precision Instruments	TM33B20
Electrodo de Cr-Ni (registro de EEG)	125 $\mu\text{m}$ Bipolar (doble)	World Precision Instruments	
Adaptador <i>Minibanana</i> (conexión electrodo- <i>headstage</i> )	2 mm	World Precision Instruments	13388
<i>Headstage</i> (conexión electrodo- amplificador)	Compatible con amplificador DAM80	World Precision Instruments	DAM80P
Amplificador (de señal PE)	Modelo DAM80	World Precision Instruments	SYSDAM80
Amplificador (de registro EEG)	Grass P55 A.C. Pre-amplifier 0,3 – 3 Hz	Grass Technologies (Instrument Division)	Grass P55
Unidad de adquisición de datos acoplada a Spike2	Micro1401-3 (Micro3 para PC via USB 2.0)	Cambridge Electronic Design	3701
Software Spike2 (adquisición de registros multicanal y paquete de análisis de señal)	Spike2 versión 5 para Windows	Cambridge Electronic Design	WS88

Hilo de tungsteno 127 $\mu$ m (electrodo de estimulación tipo <i>hook</i> )	Recubierto con Teflon® PFA 127 $\mu$ m descubierto, 203 $\mu$ m con recubrimiento	A-M Systems	796500
Sistema de microinyección (Picospritzer, generador de pulsos de presión de aire)	Bombona aire comprimido; Dispensador Picospritzer III - Intracellular Microinjection Dispense Systems: Inyector tipo <i>jet</i>	Parker Hannifin, Precision Fluidics Division	Picospritzer III
Unidad generadora de estímulos eléctricos (Grass)	Estimulador de pulsos cuadrados Modelo Grass S88 (10 mV a 150 V. 450 mA)	Grass Technologies (Instrument Division)	S88
Unidades de aislamiento de estímulos (SIUs)	Modelo A365 (corriente de hasta 10 mA, en 3 rangos. 100 V).	World Precision Instruments	A365RC
Unidades de aislamiento de estímulos (SIUs)	Modelo PSIU6 (corriente de 0.1 $\mu$ A a 15 mA en 5 rangos. 70 V)	Grass Technologies (Instrument Division)	PSIU6

**Tabla 3.** Descripción técnica y referencias comerciales del material empleado en los registros electrofisiológicos de los potenciales evocados en corteza.

### 1.3.2. Material para Estimulador Neuroprotésico

**Tabla 4. Material para el Estimulador Neuroprotésico**

Nombre (función)	Tipo/Característica/Serie	Casa Comercial	Ref.
Hilo tungsteno 50 $\mu$ m (electrodos contacto con nervio)	Recubierto con Teflon® PFA 0,005 cm descubierto, 0,011 cm con recubrimiento	A-M Systems	790700
Tubos silicona (guía tubular para nervio)	STHT®-C silicona ultrapura curada con platino, grado biofarmacéutico. Diámetro: 2 mm i.d., 3 mm o.d.	Saint-Gobain Performance Plastics. Biopharmaceutical Group	STHT-C-078- 1



Tubos vinilo (recubrimiento de electrodos para recorrido subcutáneo)	V/3A, Grado médico, gran flexibilidad Diámetro: 0,69 mm i.d., 1,14 mm o.d.	Alzet (DURECT Corporation)	0007760
Conectores circulares hembra (conector anclado a cráneo)	Familia Neuro-miniatura, Serie circular nano (6 posiciones)	Omnetics® Connector Corporation, MN-USA	A79101-001
Conectores circulares macho (conector para sistema externo)	Familia Neuro-miniatura, Serie circular nano (6 posiciones)	Omnetics® Connector Corporation, MN-USA	A79100-001
Cemento dental (fijación de conector a cráneo)	DuraLay	Reliance Dental Manufacturing Company Worth, ILL- USA	2249A - Laboratory Package
Tornillos microcirugía (fijación de conector a cráneo)	Acero inoxidable, punta roma Dimensiones: 0,28 cm diámetro cabeza, 0,16 cm longitud	Amazon Supply	B000FN0J58
Fuente Estimulación externa (generar corriente eléctrica)	Estimulador digital modelo PG4000A. Generador de pulsos con cuatro canales independientes	Cygnus Technology, Inc.	PG4000A
Muelles (recubrimiento cables)	Fabricados en aluminio, reforzados	Aeromodelismo RCMadrid	SB5
<i>Slip-rings</i> (anclaje sistema para libre movimiento)	Velocidad operante 0-300 rpm; 6 circuitos; 12,5 x 18,2 mm; Voltaje: 240 VAC/DC; Corriente: 2A	Jinpat Electronics	LPM-06A

**Tabla 4.** Descripción técnica y referencias comerciales de los componentes empleados en el desarrollo del sistema de estimulación crónica o estimulador neuroprotésico.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. DESARROLLO DEL ESTIMULADOR NEUROPROTÉSICO

El estimulador neuroprotésico consistió en tres elementos principales, i) electrodos, ii) sistema de conexión interno (desde el nervio hasta el cráneo) y externo (desde el cráneo hasta la fuente de estimulación externa), y iii) estimulador externo (Tabla 4, Fig. 4 - 6).

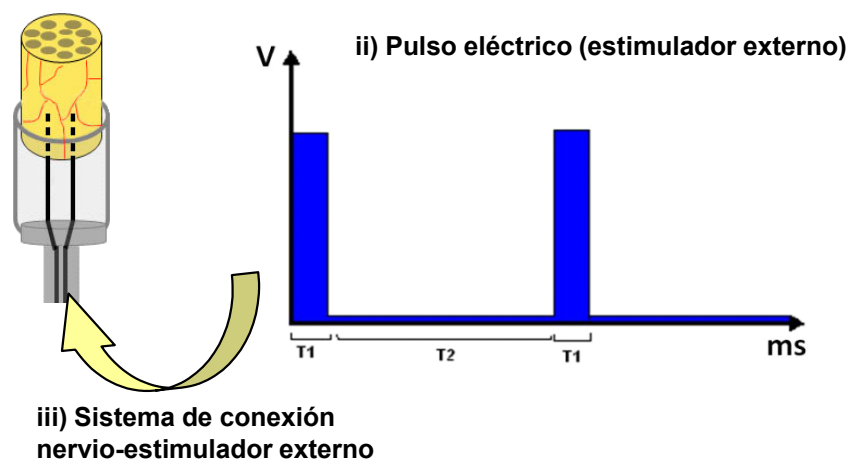
I. ELECTRODOS. Los electrodos fueron contruidos con hilo de tungsteno de 50  $\mu\text{m}$ , liberados de la cubierta de Teflon® PFA sólo en el extremo de contacto directo con el cabo del nervio amputado. Los dos hilos iban acoplados en un implante tubular de silicona (2 mm i.d. y 2,5 cm de longitud) donde se insertó el nervio tras la sección (Fig. 6d, e). La longitud total de los electrodos fue de 8 cm.

II. SISTEMA DE CONEXIÓN. Cableado interno (cuerpo del animal): La guía tubular de silicona fue unida a un tubo de vinilo de 0,69 mm de i.d. y longitud total de 5,5 cm, para el recorrido subcutáneo desde el nervio hasta el cráneo (Fig. 6c). El extremo distal de los electrodos fue soldado a sendas posiciones (#3: rojo y #1: negro) de un conector circular hembra (Omnetics®). Esta parte del conector fue sujeta al cráneo (Fig. 5a símbolo ¥ amarillo) a través de un sistema de anclaje formado por cuatro tornillos de microcirugía, y cubierto con cemento dental (Fig. 6a y 6f). La función de los tornillos (insertados en cráneo) fue dotar al conector circular de una estructura de anclaje sólida y robusta. Cableado externo (desde el cráneo del animal a la fuente de estimulación externa): El sistema de cableado externo comenzó en el conector circular macho (Omnetics®). Los cables de las posiciones #3 y #1 fueron unidos mediante conectores simples a dos de los cuatro cables de un *slip-ring* (Fig. 5b). Este dispositivo cuenta con un cilindro central rotativo y un armazón fijo que permite la rotación de los cables sin que éstos se enreden sobre sí mismos (Fig. 5c). Para esto fue fundamental mantener fijo el *slip-ring* en sus tres ejes. Esto lo conseguimos mediante el uso de tres muelles de alta resistencia, fijados al sistema de cableado situado por encima de la jaula del animal (Fig. 5b, d asterisco color rojo). Los dos cables en posiciones activas del *slip-ring* fueron conectados a su vez al estimulador externo a través de un conector tipo BCN. El sistema de cableado desde el conector circular macho hasta la base del *slip-ring* fue recubierto por un muelle de aluminio, para evitar la rotura de los cables por mordedura

de los propios roedores. Los muelles no se retrajeron en su extremo craneal, cubriendo así completamente al conector, mediante su fijación al cemento dental por un prisionero metálico enrollable.

III. ESTIMULADOR EXTERNO. La fuente de estimulación externa (Cygnus PG4000A; Tabla 3, Fig. 5d) fue programada para liberar una señal de salida con forma de onda cuadrada continua de ancho predefinido (o tiempo  $T = 0.05$  s; Fig. 5d círculo rojo). La frecuencia del pulso fue de 20 Hz. La duración de la onda con el máximo voltaje o *en alta* ( $T_1$ ) fue 0,1 ms, y *en baja* ( $T_2$ ) fue de 49,9 ms. La diferencia de potencial de la onda fue de 3V.

**i) Electrodo (nervio amputado)**



**Fig. 4.** Representación esquemática de los tres componentes principales del sistema de estimulación para la liberación de pulsos eléctricos sobre el cabo proximal del nervio amputado.

Los parámetros de estimulación fueron elegidos de una batería de estudios previos realizados en nuestro laboratorio de la UCM. Estos parámetros (3 V, 20 Hz, 100  $\mu$ s) habían sido previamente utilizados para la estimulación continua del nervio vago de conejos (en colaboración con el *Centro de Cirugía Mínimo Invasiva Jesús Usón* en Cáceres, España) y de ratas, con buenos resultados.

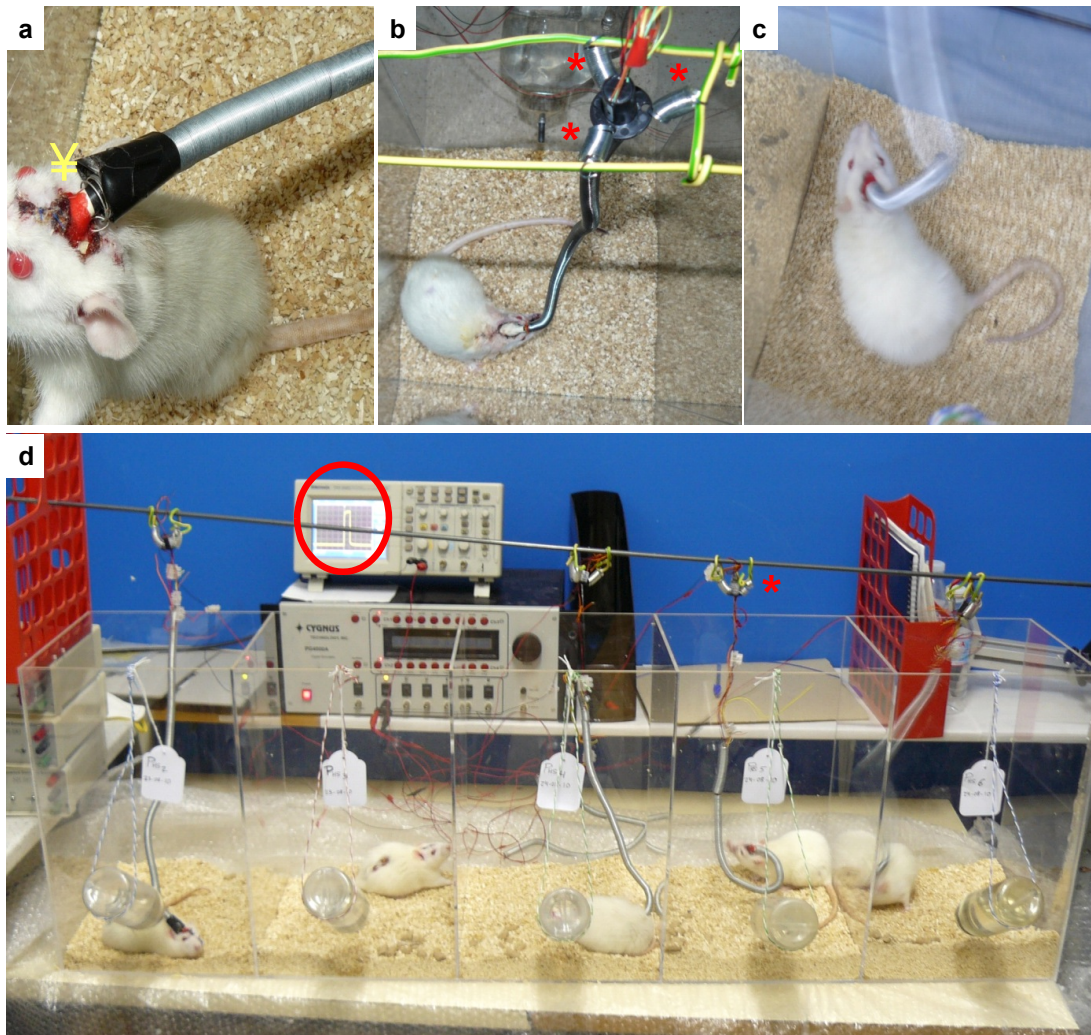
## 2.2. CIRUGÍA E IMPLANTES

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas en animales anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg i.p.) y xilacina (20 mg/kg i.p.), disminuyendo en lo posible el sufrimiento animal. La temperatura corporal estuvo continuamente monitorizada y mantenida constante a 37 °C con una lámpara de calor controlada por termostato (Ceramic Heat Emitter with Remote Sensor Thermostat 500P, SunCoast Sufgar Gliders®).

Los animales de los grupos Amputación (A) y Estimulación (S) fueron sometidos a las mismas intervenciones quirúrgicas. Una vez finalizada la cirugía se decidió al azar su inclusión en uno u otro grupo.

La cirugía para la sección completa de nervio y colocación del implante neuroprotésico puede dividirse en varias fases:

- i) Colocación de tornillos en cráneo. En primer lugar los animales fueron sujetos en un marco estereotáxico (Narishige Co., LTD., Japón, modelo SN-3N). Se realizó una incisión longitudinal sobre la piel, siguiendo la sutura sagital, para la exposición de los huesos craneales. Tras la separación de los tejidos subcutáneos y el periostio se procedió a la colocación bilateral de cuatro microtornillos, dos a dos, en los huesos parietal y frontal (Fig. 6a). La abertura craneal no fue suturada, y a lo largo de toda la intervención se aseguró la hidratación de la zona mediante lavados generosos con suero salino estéril.
- ii) Sección completa del IoN. Tras la apertura craneal, y ya fuera del estereotáxico, los animales fueron sometidos a la sección unilateral del IoN izquierdo. La almohadilla de vibras fue desinfectada y se realizó una incisión semicircular, siguiendo el límite caudal del paquete mistacial. Siempre bajo microscopio quirúrgico, se llevó a cabo el abordaje y disección del IoN (Fig. 6b), mediante la separación cuidadosa de los tejidos circundantes, desde el foramen infraorbitario. Una vez localizado el IoN, se pasó una sutura 5-0 (seda, Ethicon) por la base, moviéndose varias veces en el eje rostrocaudal para asegurar que todos los fascículos de las vibras eran tomados. Tras esta comprobación, se realizó una ligadura del IoN, con la misma sutura, en su extremo distal, a 1,5 mm de los folículos. Previo al corte, y para contrarrestar la retracción del tejido, el nervio fue sujeto en su extremo proximal, a 5 mm de la ligadura, con sutura 7-0 (nylon, Ethicon) a través del epineuro. La sección del nervio se realizó por un corte limpio de todas las fibras, a 1 mm de la ligadura distal.



**Fig. 5.** Imágenes del sistema externo de estimulación neuroprotésica (para imágenes del sistema interno, ver Fig. 6). a) Los extremos distales de los dos electrodos en contacto con el nervio fueron soldados a la porción hembra de un conector circular anclado en el cráneo del animal, indicado con el símbolo \* en color amarillo. b) La porción macho del conector circular continuaba con un cableado hasta el *slipring*, fijado en sus tres ejes (asteriscos de color rojo) para permitir la libre rotación de los cables. c) El eje rotatorio del *slip-ring* permitió en todo momento la libertad de movimiento de los animales. d) visión global de animales del grupo S. El estimulador externo producía ondas cuadráticas de frecuencia fija (círculo rojo).

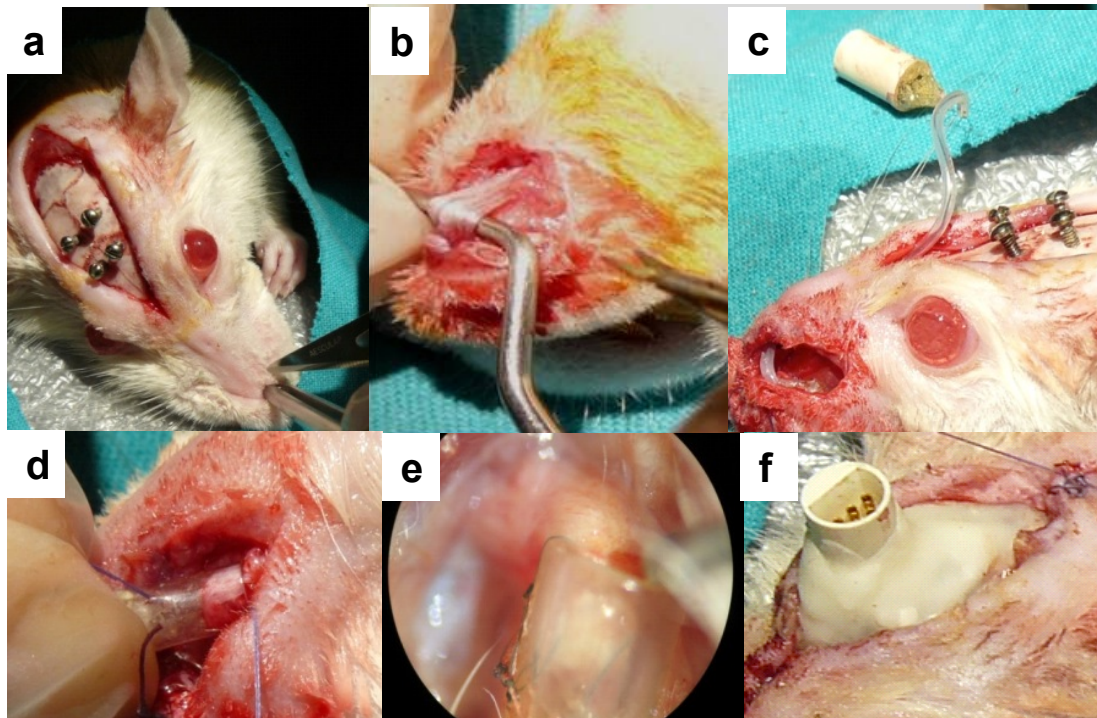
iii) Inserción del cabo proximal en el implante. Previamente a la sección del IoN, las dos aberturas, craneal y en la almohadilla de vibrisas, fueron utilizadas para colocar subcutáneamente o tunelizar el implante desde el cráneo hasta el IoN, bajo la piel del rostro (Fig. 6c). Así, inmediatamente tras la sección del nervio, el cabo proximal fue

insertado en el extremo del implante que lleva los electrodos (Fig. 6d), y fijado a él a través del epineuro mediante dos puntos con nylon 7-0 (Fig. 6e). En todos los casos, la longitud del cabo insertado en el implante fue de 4 mm. Para asegurar el resto del implante, se dieron dos puntos subcutáneos adicionales, a la altura de la curva del paquete de vibras y por encima de la nariz, respectivamente. La incisión circular fue posteriormente suturada con hilo absorbible 4-0.

iv) Sujeción craneal del implante. El extremo distal del implante, con el conector circular hembra, fue sujetado al cráneo con ayuda de cemento dental acrílico. El conector se situó entre los cuatro tornillos y el cemento fue depositándose asegurando el contacto hueso-conector. La incisión de la piel se suturó sólo por los extremos, evitando colocar piel sobre el cemento (Fig. 6f).

v) Recuperación y tratamiento post-operatorio. Tras la intervención, los animales fueron tratados con los máximos cuidados para su recuperación, asegurando una temperatura adecuada con mantas térmicas y suministrándoles suero glucosado subcutáneamente. El tratamiento postoperatorio para paliar el dolor y evitar inflamación/infección consistió en un analgésico opioideo (Buprenorphine, 0,01-0,05 mg/kg i.m., Buprex®), un antiinflamatorio no esteroideo (Meloxicam, 2,0 mg/kg s.c., Metacam®) y un antibiótico de amplio espectro (Enrofloxacin, 1,0 mg/kg s.c.). Este tratamiento fue aplicado cada 12 h durante 3 días consecutivos.





**Fig. 6.** Imágenes del sistema interno de estimulación neuroprotésica (para sistema externo, ver Fig. 5) mediante las distintas fases del procedimiento quirúrgico de los animales amputados y estimulados. a) Tras la fijación de los tornillos al cráneo, se procedió al abordaje del IoN; b) El IoN fue disecado tomando la totalidad de fascículos que inervan las vibrissas; c) Antes de la sección del nervio, el implante fue tunelizado desde el cráneo al hocico; d) Inmediatamente tras el corte, el cabo distal fue insertado en el extremo del implante que lleva los electrodos; e) Imagen bajo microscopio quirúrgico de la sutura epineural del IoN al implante de siicona; f) Sujeción del conector circular al cráneo, entre los tornillos, y con ayuda de cemento dental acrílico.

### 2.3. ESTIMULACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Tras la recuperación completa de la cirugía (aproximadamente 6 horas), los animales fueron situados en las jaulas de experimentación para comenzar, en su caso, la primera sesión de estimulación.

Estas jaulas fueron construidas en un bloque de metacrilato con cinco apartados individuales (Fig. 5d), permitiendo así el contacto visual entre los animales. Las jaulas tenían base cuadrada de 15 cm de lado, para permitir los movimientos libres de los animales, 50 cm de altura, y estaban abiertas por el techo para asegurar el espacio del sistema de cableado para la estimulación (Fig. 5b).

Debido a que sólo disponíamos de dos bloques de jaulas, dividimos la experimentación en cuatro fases. En cada fase se trabajó con 5 animales Estimulados y 5 animales sólo Amputados.

A todos los animales intervenidos se les conectó el sistema externo, a través del conector circular macho. La diferencia entre los grupos fue que los animales pertenecientes al grupo S recibieron corriente eléctrica (pulsos cuadrados de 100  $\mu$ s, 3.0 V, a 20 Hz) a través de los electrodos, mientras que el estimulador externo de los animales del grupo A no se encendió en ningún momento del experimento.

La primera sesión de estimulación comenzó inmediatamente tras la recuperación de la cirugía, a las 6-8 horas después de la lesión del nervio. Durante los 28 días, los conectores hembra-macho de todos los animales se acoplaban a las 8.00 h de la mañana y se separaban a las 20.00 h. Así, los animales S recibieron 12 h de estimulación continua cada día. Es notable resaltar que los animales estuvieron perfectamente conscientes durante las cuatro semanas (Fig. 5c), y en ningún caso fueron administrados sedantes que limitasen el libre movimiento.

El peso y estado general de salud de los animales fueron registrados diariamente. Ante síntomas claros de sufrimiento, infección o rotura del implante externo, los animales fueron inmediatamente liberados y apartados de la experimentación. Las bajas (20% del total) fueron reemplazadas por nuevos animales hasta completar la  $n = 20$  de cada grupo.

Tras las cuatro semanas de experimentación, y al final de la última sesión de estimulación, los animales fueron nuevamente anestesiados para realizar el estudio electrofisiológico.

## 2.4. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO.

Para el estudio electrofisiológico, tomamos al azar ocho animales de cada grupo experimental. Los registros se realizaron tras la última sesión de estimulación (en caso de animales S) o después de los 28 días de experimentación (en caso de los animales C y A).

En todos los casos (C, A y S) registramos los potenciales de campo (o potenciales evocados, PEs) de la corteza somatosensorial, siguiendo el protocolo descrito en Whittingstall and Logothetis (Whittingstall and Logothetis, 2009). Las respuestas corticales fueron evocadas por estimulación periférica mediante inyección de corriente



al nervio intacto (animales C) o al cabo proximal del nervio IoN amputado (en caso de animales de los grupos A y S). El nivel de anestesia fue controlado mediante el registro del EEG, manteniéndolo con inyecciones suplementarias del 10% de la dosis inicial de anestesia. En los animales C, además, se registró la actividad cortical tras la aplicación de estímulos mecánicos (pulsos de aire comprimido) sobre la almohadilla de vibrisas. Durante todo el procedimiento, la temperatura del animal fue monotorizada manteniéndola a 37°C.

Tras la consecución de un plano anestésico adecuado (ketamina/xilacina i.p. 100/20 mg/kg, respectivamente), los animales fueron situados en el marco estereotáxico (Narishige Co., LTD., Japón, modelo SN-3N). Para la inserción de los electrodos (registro y EEG) se realizó una ventana craneal con un taladro manual, en las coordenadas aproximadas del centro de la matriz de los *barriles* corticales (C3) a 2,5 – 3 mm caudal y 5,5 mm lateral a Bregma (Chapin and Lin, 1984). El microelectrodo de registro, bipolar de tungsteno (impedancia de 1,0 MΩ) fue insertado a 600 μm desde la superficie pial. Un macroelectrodo doble accesorio fue colocado para el registro del EEG cortical.

La estimulación del nervio/neuroma se llevó a cabo por la aplicación directa de corriente a través de un electrodo casero de gancho (*hook*). El nervio o neuroma del IoN fue expuesto por una meticulosa limpieza de los tejidos circundantes (grasa y conectivo neovascularizado abundante en los animales A y S, principalmente). Una vez disecado, el nervio/neuroma fue rodeado con el electrodo de gancho para la inyección de corriente en forma de trenes de pulsos de 200 μs de duración proporcionados a una frecuencia de 1 Hz. Para homogeneizar la respuesta obtenida entre los distintos grupos experimentales, antes de comenzar los protocolos de estimulación descritos se estableció la intensidad de estimulación mínima requerida para evocar una respuesta cortical identificable en cada caso. De este modo, a cada animal se le aplicó tres trenes de 50 pulsos a intensidades de estimulación 2x, 5x la intensidad mínima. Para este procedimiento usamos un generador de estímulos Grass (Grass S88) y su correspondiente unidad de aislamiento de estímulos (A365 SIU, por sus siglas en inglés *Stimulus Isolation Unit*).

En los animales S, previamente a la colocación de los electrodos de registro y del electrodo de gancho, se comprobó la funcionalidad de los electrodos de estimulación del implante neuroprotésico aplicando corriente eléctrica de los mismos parámetros a los

utilizados en la estimulación crónica (pulsos cuadrados de 100  $\mu$ s, 3,0 V a 20 Hz; Fig. 5) y registrando los PEs en corteza.

La estimulación mecánica de las vibrisas en los animales C se realizó mediante pulsos de aire comprimido aplicados con una bomba de presión neumática (Picospritzer III). La dirección de los pulsos de aire siguió el eje rostrocaudal a la almohadilla mistacial, acoplando para ello un tubo de silicona de 0,5 mm de diámetro al microinyector de aire. Esta forma de estimulación es semejante al contacto del bigote de la rata con un objeto en movimiento en la dirección rostrocaudal, provocando un desplazamiento de la vibrisa de una manera natural, con su consiguiente vibración libre. Antes de comenzar la estimulación con los pulsos de aire, se registró la actividad espontánea durante 180 s. Tras este tiempo se aplicó una serie de 10 pulsos de 100 ms de duración a 0,5 Hz

Para la adquisición de datos usamos una unidad Micro1401 MkII con software Spike2 de Cambridge Electronic Devices. Para cada registro calculamos el valor medio ( $\mu$ ) y el error estándar de la media (SEM) de la señal no filtrada (1 Hz-100 KHz) 200 ms antes y 200 ms después de proporcionar el estímulo. Utilizamos los valores mínimos y máximos de  $\mu \pm 1$  SEM en los 200 ms previos al estímulo como umbrales para determinar la aparición y desaparición de los potenciales evocados (Fig. 16A). La latencia de la respuesta fue considerada como el intervalo de tiempo entre el comienzo del estímulo y el momento en que el PE cruza  $\mu \pm 1$  SEM por primera vez. Además de la latencia se determinó el área comprendida en el componente negativo del PE.

Al finalizar la sesión de electrofisiología, los animales fueron anestesiados profundamente para el sacrificio por perfusión intraventricular de un líquido fijador.

## 2.5. SACRIFICIO, OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE TEJIDOS

- **PERFUSIÓN:** Los animales fueron sacrificados por perfusión intraventricular de paraformaldehído<sup>1</sup> al 4% (PAF) bajo anestesia profunda con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (40 mg/kg) i.p. Tras comprobar la ausencia de reflejos, los animales fueron sujetos a la mesa de perfusión en decúbito supino. Se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la línea media ventral, a la altura del extremo caudal del esternón, en el abdomen superior. Utilizando la exposición de la apófisis xifoides, se accedió al corazón mediante la rotura del diafragma y el seccionamiento por costotomía bilateral, en eje diagonal, de la caja torácica. El

catéter de la bomba peristáltica fue introducido inmediatamente por el ventrículo izquierdo para su salida a través de la aorta. En el momento de penetración del catéter, la bomba fue accionada, para la liberación de una solución limpiadora de suero salino<sup>2</sup> fisiológico (100 mL aproximadamente) seguida del líquido fijador o PAF 4% (500 mL aprox.). Para evitar el incremento de presión intravascular, se realizó un ligero corte en la orejuela derecha, inmediato al encendido de la bomba. Tras la fijación, se procedió a la extracción del encéfalo, tomando como límite caudal la médula a nivel C2.

- **POSTFIJACIÓN/CRIOPROTECCIÓN.** Las muestras extraídas tras la perfusión fueron incluidas en la misma solución fijadora, PAF 4%, toda la noche (t/n) a 4 °C y en agitación. Este proceso tiene el objetivo de endurecer las muestras para su posterior seccionamiento. Tras la (post)fijación en PAF, las muestras fueron incluidas en una solución de crioprotección<sup>4</sup>, con sacarosa al 30%, para poder ser seccionadas en criostato (-20 °C). En esta solución se mantuvieron a 4 °C hasta el hundimiento (indicativo de densidad por suficiente penetración de la sacarosa), aproximadamente 48 h.

Una vez crioprotegidas, las muestras fueron preparadas para el seccionamiento o almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

- **SECCIONAMIENTO.** El seccionamiento se realizó a -20 °C en criostato (Microm HM550). Este proceso, aunque sencillo, requirió una gran organización puesto que es clave para poder aplicar adecuadamente las técnicas estereológicas. Previo al seccionamiento, las muestras fueron incluidas en un molde adecuado con Tissue-Tek<sup>®</sup>, que congela formando una estructura endurecida para facilitar el corte. En todos los casos se siguió un seccionamiento sistemático seriado de la totalidad del tejido. Las series sucesivas de cortes fueron utilizadas para distintos marcadores o técnicas de tinción.

El seccionamiento del encéfalo se hizo siguiendo el eje horizontal, con los dos hemisferios. En algunos casos se siguió un eje de corte tangencial a la corteza. Los cortes fueron recogidos en una sucesión ordenada de pocillos con PB 0,1 M para ser reaccionados en flotación. De forma general, el encéfalo fue cortado en 6 series sucesivas, a 40-50 µm. En un mismo pocillo, entre un corte y el consecutivo hubo 240-300 µm máximo de diferencia. De esta manera todos los niveles estaban representados en cada pocillo.

- **ALMACENAMIENTO DE CORTES.** Los cortes recogidos en PB o flotación que no fueran a ser reaccionados inmediatamente se almacenaron bien en placas con PB azida<sup>5</sup> (para tiempos breves de almacenamiento) a 4 °C, o en solución anticongelante<sup>6</sup> (para tiempos largos de almacenamiento) a -20 °C.

<sup>1</sup>**Paraformaldehído 4% (PAF 4%).** Disolver 40 g de paraformaldehído comercial en 1 L de PB 0,1 M<sup>2</sup>, a 60 °C y bajo campana de extracción. Ajustar con NaOH a pH 7,4.

<sup>2</sup>**Tampón Fosfato (PB) 0,1 M a pH 7.2-7.4** Mezclar 180 mL de solución A (2,76 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O en 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada -H<sub>2</sub>Od-) + 810 mL de solución B (14,77 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 900 mL de H<sub>2</sub>Od).

<sup>3</sup>**Suero Salino.** NaCl 0,9% en H<sub>2</sub>Od.

<sup>4</sup>**Sacarosa 30%.** Disolver 30 g de sacarosa comercial en 100 mL de PB 0,1 M.

<sup>5</sup>**PB 0,1 M con Azida 0,1%.** Disolver 1 g de NaN<sub>3</sub> en 1 L de PB 0,1 M.

<sup>6</sup>**Solución anticongelante.** Mezclar 300 mL de Glicerol + 300 mL de EtilénGlicol + 300 mL de H<sub>2</sub>Od. Enrasar hasta 1 L con PB 0,1 M.

## 2.6. TÉCNICAS DE TINCIÓN

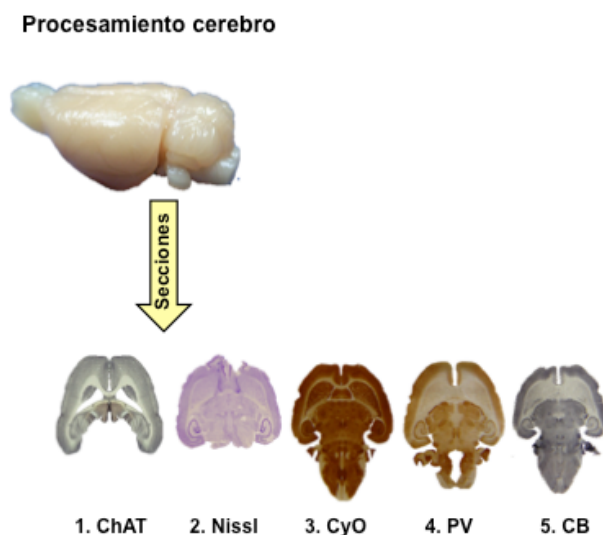
### 2.6.1. Técnicas histológicas clásicas.

#### MÉTODO DE NISSL

La técnica de Nissl está basada en la afinidad de los colorantes básicos por sustancias ácidas como el ADN y el ARN de las células. Con esta tinción pueden verse los núcleos celulares, nucleolos, polirribosomas y, sobre todo, los acúmulos de retículo endoplásmico rugoso que forman los grumos cromáticos o de Nissl, revelándose de esta forma la citoarquitectura general del tejido y la estructura del cuerpo celular. Esta técnica sirve de referencia para el resto de tinciones y es especialmente útil para la identificación de las capas corticales y de los tipos celulares del TG.

La técnica de Nissl fue aplicada a la serie 2 de todos los cerebros (Fig. 7) como una variación al método original de Nissl (Cajal and de Castro y Pascual, 1933), utilizando como colorante el violeta de cresilo (colorante básico de anilina). Los cortes, recogidos en flotación, fueron montados directamente sobre portas gelatinizados<sup>7</sup> desde PB 0,05M. Los portaobjetos se colocaron en cestillas de cristal y se dejaron secar a temperatura ambiente, protegidos del entorno y la humedad, durante, al menos, 12 h. Un paso imprescindible para esta tinción es, previo a la incubación con el colorante, la fijación en alcohol. El alcohol, aunque no es un mordiente en sentido estricto, facilita la

coloración de los gránulos de Nissl. Tras el secado, los cortes se mantuvieron 12 h en cristalizadores con etanol de 70°. Tras esto, se procedió a una hidratación rápida con agua destilada y a la incubación en la solución de violeta de cresilo<sup>8</sup>, a 45 °C y en agitación durante 25-30 min. El exceso de violeta se eliminó mediante lavados sucesivos con agua destilada. A esto le siguió pasos rápidos en alcoholes crecientes (70°, 96°) y la incubación en cloroformo 100% (agitación) durante 10 min. aproximadamente. Tras un nuevo paso rápido por etanol 96°, las preparaciones se incubaron en la solución diferenciadora<sup>9</sup>, bajo control visual. Una vez conseguida la diferenciación de las estructuras celulares y el grado de coloración adecuado, los portas pasaron por etanol 100° para decolorar el fondo del preparado y luego a una serie de pasos en xileno ('xilol'), donde permanecieron alrededor de 30 min. Finalmente las preparaciones fueron cubiertas con medio de montaje transparente (DePeX<sup>®</sup>, Serva).



**Fig. 7.** Representación gráfica de las técnicas aplicadas sobre las secciones seriadas de cerebro. Sobre la serie 1 se llevó a cabo IHQ contra la ChAT para revelar la inervación colinérgica. La serie 2 se procesó para la tinción de Nissl, fundamental para mostrar la citoarquitectura tisular y estructura celular. La serie 3 siguió la técnica de la CyO, para manifestar la actividad de la enzima citocromo c oxidasa. Las series 4 y 5 se procesaron para IHQ contra las proteínas ligantes de calcio: Parvalbúmina (PV) y Calbindina (CB), respectivamente.

<sup>7</sup>**Solución para gelatinizar portas.** Gelatina 1% + Alumbre de cromo 0,2%. Disolver a 60 °C durante 1 h.

<sup>8</sup>**Violeta de cresilo 0,1%.** Disolver 0,5 g de cristal violeta en 500 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Añadir 2,5 mL de ácido acético glacial. Filtrar antes de uso.

<sup>9</sup>**Diferenciador para Nissl.** 17 mL de ácido acético glacial, enrasar a 1L con etanol 96°.

<sup>10</sup>**Citocromo Oxidasa. Solución de incubación.** Citocromo-C 0,04% +DAB 0,05% + sacarosa 4% en PB 0,1 M pH 7,2-7,4. Diluir primero los dos componentes, y, sólo después, añadir la sacarosa. Proteger de la luz.

### 2.6.2. Técnicas histoquímicas. Citocromo oxidasa - CyO

Como se ha comentado en la sección precedente de Diseño Experimental (Elección de Marcadores Moleculares), la actividad de la enzima citocromo oxidasa se utiliza como un marcador de *actividad metabólica neuronal*. El objetivo de la técnica es “cuantificar” la cantidad de citocromo oxidasa en nuestro tejido. Para ello, inducimos la activación enzimática, aportando sus sustratos naturales (sacarosa + citocromo c), y añadimos un reactivo que al oxidarse polimeriza formando un precipitado marrón insoluble y cuantificable (DAB).

La serie 3 de todos los cerebros fue reaccionada para la técnica CyO (Fig. 7) en flotación, utilizando el protocolo original de Wong-Riley (Wong-Riley, 1979). Brevemente, tras los lavados en PB 0,1 M para eliminar el exceso de Tissue-Tek<sup>®</sup>, las secciones se pasaron a la solución de incubación<sup>10</sup>, protegidas de la luz, y se dejaron al menos 3-4 h en agitación a 37 °C para favorecer la reacción enzimática. Una vez alcanzado el grado óptimo, y bajo control visual cada 45 min. aproximadamente, los cortes fueron lavados en PB 0,1 M frío para detener la reacción enzimática. Tras esto, se pasó al montaje seriado de los mismos sobre portas gelatinizados desde PB 0,1 M diluido 1/3 en H<sub>2</sub>O destilada. Una vez secos, los cortes fueron deshidratados por pasos en alcoholes crecientes (70°, 96°, 100°) y luego aclarados en xileno (30 min). Las preparaciones fueron cubiertas con medio de montaje transparente (DePeX<sup>®</sup>, Serva).

### 2.6.3. Técnicas de Inmunomarcado

El empleo de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) nos permitió detectar los marcadores moleculares y tisulares elegidos para nuestro estudio, mediante reacciones de alta especificidad antígeno-anticuerpo (Ag-Ab). Todas las técnicas empleadas fueron indirectas; es decir, empleando Ab secundarios conjugados con las moléculas responsables del inmunomarcado (biotina en nuestro caso).

Todas las IHQ se realizaron en flotación y siguiendo la técnica del complejo avidina-biotina (ABC). Este método se basa en la elevada afinidad de la voluminosa glicoproteína avidina y la vitamina biotina. La biotina acoplada al Ab 2º es el sitio de unión del complejo bandera avidina-peroxidasa biotinilada. La reacción de inmunomarcado se consigue por la acción de la enzima peroxidasa, que oxida al DAB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El DAB oxidado forma un precipitado marrón, constituyendo la

señal indirecta de la presencia y cantidad (intensidad) del Ag revelado. El protocolo general que utilizamos se resume a continuación.

Una vez recogidos los cortes se hicieron los lavados sucesivos con PB 0,1 M para eliminar los posibles restos de sacarosa. Tras esto, se procedió a la inhibición de las peroxidasas endógenas<sup>11</sup> con una solución saturante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min). Le siguió una incubación con suero normal de burro (DNS 1:50 en solución de suero<sup>12</sup>; 1 h, T<sup>a</sup> amb). Después de esto, se bloquearon la biotina y receptores de biotina, así como los posibles lugares endógenos de ligadura de avidina con un kit de bloqueo comercial<sup>13</sup> (45 min).

Una vez bloqueados todos los posibles motivos que pudieran producir tinción de fondo y enmascarar el resultado de la tinción IHQ, se procedió a la incubación con el Ab primario (Ab 1rio, en solución de Ab<sup>14</sup>), específico al epítipo que se quiere estudiar (18-22 h, 4 °C, agitación). A esto le siguió la incubación de los cortes con el Ab 2rio biotinilado (1/150 en solución de Ab<sup>14</sup>, 2 h, T<sup>a</sup> amb). Después de esta incubación, los cortes pasaron al kit de ABC comercial<sup>15</sup> (1 h, T<sup>a</sup> amb), con el complejo bandera avidina-biotina-peroxidasa. Siempre se hicieron lavados en PB 0,1 M entre cada paso de la IHQ. El revelado<sup>16</sup> se hizo en dos pasos, primero una pre-incubación en DAB (10 min), a la que siguió la solución de revelado final con DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La intensidad de la tinción se supervisó cada pocos minutos bajo microscopio; cuando el inmunomarcado fue satisfactorio la reacción se paró mediante varios lavados en tampón Tris-HCl<sup>17</sup> frío. El inmunomarcado en algunos casos fue intensificado con Ni (2% en PB 0,1 M, 2 min). Los cortes se montaron de forma seriada sobre portas gelatinizados, para finalmente ser deshidratados con alcoholes crecientes (70°, 96°, 100°) y aclarados en xileno (30 min). Las preparaciones se cubrieron con medio de montaje transparente (DePeX<sup>®</sup>, Serva).

Al tratarse de anticuerpos muy bien caracterizados y de patrones de marcado ampliamente estudiados (Avendano et al., 1996; Celio, 1990; Eckenstein et al., 1988), no se consideró necesario realizar controles positivos de inmunotinción.

Se utilizaron las siguientes concentraciones (para más detalles sobre las características de los Ab, ver Tabla 2):

- **Parvalbúmina (PV):** Marcador para el parámetro morfológico *circuitos inhibitorios corticales*. La serie 4 de todos los cerebros fue reaccionada para PV (Fig. 7) utilizando un Ab 1rio monoclonal producido en ratón (Mouse anti-PV clon PARV-19), a una dilución de 1/2000. El Ab 2rio era obtenido de burro y conjugado a biotina (Biotina-SP-Donkey-Anti-Mouse).

- **Calbindina D-28k (CB):** Marcador para el parámetro morfológico *circuitos inhibitorios corticales*. La serie 5 de todos los cerebros fue reaccionada para CB (Fig. 7) utilizando un Ab 1rio monoclonal producido en ratón (Mouse anti-CB, clon McAB 300), a una dilución de 1/5000. El Ab 2rio era obtenido de burro y conjugado a biotina (Biotina-SP-Donkey-Anti-Mouse).
- **Colina Acetiltransferasa (ChAT):** Marcador para el parámetro morfológico *inervación colinérgica cortical*. La serie 1 de todos los cerebros fue reaccionada para ChAT (Fig. 7) utilizando un Ab 1rio policlonal producido en cabra (Goat anti-ChAT), a una dilución de 1/150. El Ab 2rio era obtenido de burro y conjugado a biotina (Biotina-SP-Donkey-Anti-Goat).

<sup>11</sup>**Inhibición de peroxidasas endógenas:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PB 0,1 M pH 7,2-7,4.

<sup>12</sup>**Solución de suero (general):** BSA 0,25% + NaN<sub>3</sub> 0,1% en PB 0,1 M pH 7,2-7,4.

<sup>13</sup>**Kit de Bloqueo Avidina/Biotina:** Vector® Laboratories, SP2001, siguiendo las instrucciones de manufactura.

<sup>14</sup>**Solución de anticuerpo (general):** BSA 0,1% + NaN<sub>3</sub> 0,05% + Tx100 0,4% en PB 0,1 M pH 7,2-7,4.

<sup>15</sup>**Kit ABC Vectastain:** Vector® Laboratories, PK4000, siguiendo las instrucciones de manufactura.

<sup>16</sup>**Revelado DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Pre-incubación: DAB 0,05% en tampón Tris-HCl<sup>17</sup> 0,1 M. Final: DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,003% de una solución stock al 30%).

<sup>17</sup>**Tampón Tris-HCl** 0,1 M a pH 7,6. Disolver 12,11 g de Tris en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, ajustar pH con HCl 1N. Enrasar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

## 2.7. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Los análisis morfológicos se realizaron en un microscopio Olympus BX51 adaptado para recuentos estereológicos. Este microscopio cuenta con un sistema interactivo compuesto por una platina monitorizada de elevada precisión, un microcator con resolución de 0,5 mm (Heidenhain VZR401), una videocámara JVC TK-C1380 y un monitor de video. El control de los movimientos de la platina y las plantillas interactivas para los recuentos son proporcionados por el software de estereología CAST-GRID® (Olympus Denmark).



Las variables *volumen cortical*, *volumen de estructuras subcorticales* y *circuitos inhibitorios corticales* (número de interneuronas PV- y CB-positivas) fueron analizadas mediante técnicas estereológicas. Las variables *actividad metabólica cortical* (intensidad neuropilo-CyO) e *inervación colinérgica cortical* (intensidad neuropilo-ChAT) fueron analizadas mediante cuantificaciones de densidad óptica relativa, por procesamiento bidimensional de imágenes (Fig. 3B, detalle).

### 2.7.1. Análisis morfométricos 3D. Técnicas estereológicas

#### ESTIMACIÓN DE VOLÚMENES. Método de Cavalieri

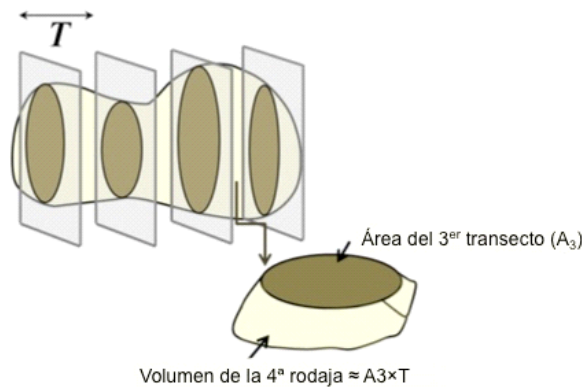
El volumen de un objeto con forma arbitraria puede ser estimado de forma insesgada a partir de la secuencia de secciones paralelas obtenidas al cortar el objeto a una distancia fija, T (Fig. 8). La primera sección debe ser muestreada uniformemente al azar en un intervalo (0, T). Este es el principio básico del método de Cavalieri. Por ejemplo, un objeto dado es cortado por cuatro planos paralelos, originando cinco rodajas. El área cada rodaja transversal se cuantifica o estima de forma independiente. El volumen del objeto seccionado en cada una de estas rodajas es estimado mediante la suma de las áreas y multiplicado por la separación media de los planos de corte (T; Eq. 1; Fig. 8):

$$\text{Eq. 1 :} \quad \hat{V} = (T \cdot A_1) + (T \cdot A_2) + \dots + (T \cdot A_m) = T \cdot \sum_{i=1}^m A_i$$

donde  $A_i$  es el área de cada sección transversal del objeto seccionado.

El cálculo del área no necesita un alto grado de precisión. Esta estimación puede hacerse, con una óptima precisión, aplicando un método sencillo como *el recuento de puntos* (Gundersen et al., 1988). El recuento de puntos puede realizarse utilizando una retícula (Fig. 9A), que es una sonda geométrica donde cada punto tiene asociado un área determinado,  $a(p)$ , que es el producto de las distancias entre los puntos en las direcciones x- e y-. Esta retícula se sitúa al azar sobre cada sección que contiene el área de referencia con los perfiles de interés y se cuenta el número de puntos que interseccionan con los perfiles. El área total de los perfiles es el producto de la suma de estos puntos por una constante, el área asociada a cada punto de la retícula.

La combinación de una retícula de puntos situada de forma aleatoria sobre una sección, también aleatoriamente dispuesta, es igual que si dispusiésemos una retícula de



**Fig. 8.** Representación esquemática del método de cavalieri para la estimación de volumen de un objeto no uniforme.

puntos tridimensional. Aplicando este método, el volumen es estimado por la siguiente ecuación (Eq. 2):

$$\text{Eq. 2} \quad V = a(p) \cdot T \cdot \sum_{i=1}^m P_i(X)$$

donde  $a(p)$  es el área asociada a cada punto de muestreo,  $T$  es la distancia media entre dos secciones consecutivas,  $m$  es el número de secciones estudiadas y  $\sum_{i=1}^m P_i(X)$  es la suma de los puntos coincidentes con el objeto diana (para más detalles, ver Bermejo et al., 2003; Howard and Reed, 1998).

Las estimaciones de volúmenes de la corteza de *barriles* y estructuras subcorticales (núcleo talámico VPM y núcleo Pr5 del tronco) se realizaron sobre secciones horizontales en los tres grupos experimentales, aplicando el método de Cavalieri sobre recuento de puntos (Gundersen et al., 1988). Las mediciones se realizaron con una magnificación de trabajo de 80X, utilizando el equipo estereológico descrito anteriormente.

En todos los casos el recuento se hizo sobre los hemisferios ipsi y contralateral de la totalidad de los cortes de la serie reaccionada para CyO (Fig. 7, serie 3) que incluían las estructuras. En el caso de la corteza, además, se hicieron recuentos independientes para las capas corticales II/III y IV, respectivamente, así como un recuento global sobre el

PMBSF (sin considerar la laminación, desde el inicio de la capa II hasta el final de la capa IV). Todas las estructuras, incluidas las capas corticales, fueron delimitadas utilizando las secciones adyacentes teñidas con el método de Nissl. El esquema de muestreo fue cuidadosamente planeado para contar entre 100 y 200 puntos en cada estructura de destino por hemisferio, en un total de 10-15 secciones, y resultando en coeficientes de error (CE) entre 1% y 4%. La precisión de todas las estimaciones estereológicas fue determinado estimando el CE descrito para muestreo sistemático al azar (Cruz-Orive, 1999).

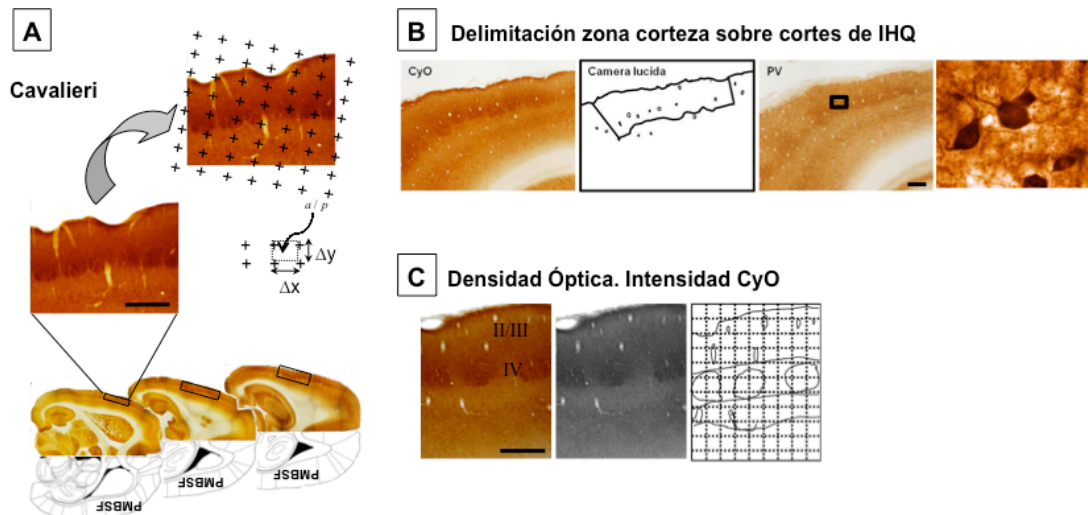
#### ESTIMACIÓN DE POBLACIONES NEURONALES. *Fraccionador Óptico*

Para cuantificar el número de interneuronas corticales PV- y CB-positivas (N) empleamos un método estereológico insesgado, el fraccionador óptico (West et al., 1991). En esta técnica no es necesario conocer el volumen del espacio de referencia, y la estimación de número de neuronas se hizo aplicando un muestreo fraccionado, de forma análoga al aplicado en las diluciones para recuentos bacterianos. El esquema de muestreo del fraccionador fue aplicado en tres estados sucesivos (fracción usada del número total de secciones, fracción de área estudiada en cada sección y fracción del espesor del corte), de cuyo producto emerge una fracción final o total de muestreo de  $\sim 1:107$ . El número de perfiles o unidades contadas en la última fracción se multiplicó por la inversa de las fracciones para obtener la estimación del número total de neuronas. Debido a la variabilidad en la inmunoexpresión proteica, tanto para PV como para CB, establecimos unos criterios básicos para determinar la unidad de recuento (citoplasma neuronal), basados en el inmunomarcado del núcleo y las dendritas (ver Resultados y Fig. 12A para PV, Fig. 12B para CB).

Debido a que la variabilidad en el grosor de las secciones (por el propio corte y tratamiento histológico) es una fuente potencial de sesgo, ponderamos la contribución relativa de cada sección (midiendo la profundidad media en z) al número final de neuronas (para más detalles, ver Avendano et al., 2005).

El recuento del número de interneuronas totales PV- o CB-positivas en la corteza de *barriles* se hizo en los hemisferios ipsi y contralateral sobre la totalidad de los cortes de la serie reaccionada para PV o CB, respectivamente (Fig. 7, series 4 y 5), que incluían esta estructura cortical. Para cada marcador, hicimos tres recuentos independientes: N de las capas corticales II/III, N de la capa cortical IV, y N global sobre el PMBSF (sin

considerar la laminación, desde el inicio de la capa II hasta el final de la capa IV). El recuento se hizo bajo objetivo planapocromático x100, empleando aceite de inmersión con una lente de apertura numérica 1,4 (S-Plan Apo 100; Olympus Optical, Hamburg, Germany). El área correspondiente al PMBSF de cada corte reaccionado para PV o CB fue delimitado empleando plantillas dibujadas bajo cámara lucida de los cortes adyacentes de CyO (utilizando los vasos sanguíneos y artefactos como indicadores, Fig.



**Fig. 9.** A) Estimación de volumen de la corteza de *barriles* (*barrel cortex*, PMBSF) mediante el estimador de Cavalieri por el recuento de puntos, aplicado sobre secciones seriadas reaccionadas para CyO. B) Procedimiento para la delimitación del PMBSF en las secciones inmunohistoquímicas utilizando los cortes reaccionados para CyO adyacentes. La separación exacta de las capas corticales II/III-IV se hizo utilizando la sección de Nissl adyacente. C) Procedimiento de muestreo para el análisis de la intensidad de neuropilo cortical o densidad óptica, sobre microfotografías de secciones reaccionadas para CyO. Barra indica 500  $\mu\text{m}$ .

9B). Esta plantilla se utilizó como guía para delinear el área de interés en los cortes de PV y CB. Las secciones de la serie 2 (Fig. 7) teñidas con el método de Nissl fueron empleadas para delimitar con exactitud la separación entre las capas corticales.

### 2.7.2. Análisis morfométricos 2D

#### EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN - DENSIDAD ÓPTICA

Esta técnica la empleamos para cuantificar dos variables en la corteza somatosensorial: actividad metabólica e innervación colinérgica. En el primer caso, las mediciones se hicieron sobre cortes reaccionados para CyO. Para el estudio del neuropilo colinérgico, las mediciones se hicieron sobre cortes inmunomarcados para ChAT. La delimitación de la zona de estudio, corteza de *barriles* o PMBSF, se hizo con los cortes de CyO (Fig. 9C). La delimitación exacta de las capas corticales se hizo, además, con ayuda de los cortes adyacentes teñidos con el método de Nissl.

En ambos casos trabajamos sobre imágenes, determinando la intensidad por mediciones de densidad óptica relativa, siguiendo el protocolo de (Valla et al., 2001). Los cortes fueron codificados para que el operador fuera ciego en todo el proceso a la identidad de los sujetos.

Las mediciones de densidad óptica (DO) fueron obtenidas, como para el resto de parámetros, tanto de las capas II/III y IV por separado, como del conjunto II-IV. Este procedimiento se organizó en distintas fases: 1) todas las secciones fueron digitalizadas usando el mismo microscopio de campo claro con objetivos planapocromáticos (2.5x, 4x, 10x, 20x) cada sección tisular fue muestreada usando un gradiente de escala de grises de 1 a 256 (blanco a negro) a una resolución de 3000 dpi; 3) realizamos un muestreo sistemático al azar tanto a nivel de sección (fracción 1/3 aproximadamente) como a nivel de espacio de referencia (fracción 1/6 aprox. de cada área cortical específica). Como consecuencia, analizamos tres secciones de cada serie, y en cada sección se tomaron cinco mediciones de tamaño constante (muestras de 10 x 10 píxeles); 4) para cada muestra se calculó el valor de DO medio utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA); 5) posteriormente se calculó el valor medio de DO de todas las muestras de cada sección; 6) en cada sección se tomaron tres mediciones de DO adicionales en áreas de fondo blanco; 7) se realizó una corrección de para cada imagen, substrayendo el valor medio de DO del fondo al valor original medio de DO obtenido.

De este modo, para cada animal, perteneciente a cada grupo experimental, se obtuvieron quince mediciones del hemisferio izquierdo (o ipsilateral a la lesión) y quince mediciones del hemisferio derecho (o contralateral a la lesión). Los valores de

DO finales, tanto para CyO como para ChAT, fueron dados como unidades arbitrarias entre 0 y 255.

## 2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para evaluar los resultados de la actividad funcional en las distintas condiciones experimentales, comparamos los PEs mediante ANOVAs multifactoriales. Cuando el ANOVA devolvió un  $P < 0,05$ , hicimos las comparaciones múltiples *a posteriori*, utilizando el método de Fisher de la diferencia menos significativa (LSD, *least significant difference*).

Para todas las variables anatómicas (actividad metabólica, volumen, número de interneuronas, innervación colinérgica; Fig. 1) se llevaron a cabo análisis estadísticos de tipo paramétrico, previa comprobación del cumplimiento de normalidad de la distribución ( $P > 0,05$  en test de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad de las variables ( $P > 0,05$  en test de Bartlett).

Comparaciones intragrupo: Se hicieron con el objetivo de analizar el efecto de la manipulación periférica dentro de cada grupo experimental (C, A, S). En todos los casos se compararon los valores medios, de cada variable dada, obtenidos para los hemisferios o lados derecho (contralateral, *cl*) e izquierdo (ipsilateral, *il*). Las comparaciones interhemisféricas se realizaron mediante test-t de Student pareado y no direccional.

Comparaciones intergrupo: Para este análisis definimos la variable “porcentaje de cambio medio contralateral versus ipsilateral”, *cl/il* (%) [ó *il/cl* (%) en el caso de Pr5]:

$$cl/il (\%) = 100 * (\text{contralateral} - \text{ipsilateral}) / \text{ipsilateral}$$

Las comparaciones intergrupo se testaron mediante un ANOVA unifactorial, tomando como variable independiente el porcentaje de *cl/il* (%), y como factor el grupo experimental (C, A, S). Cuando  $P < 0,05$ , se hicieron las comparaciones múltiples *a posteriori* por el método LSD.

El nivel de significación ( $\alpha$ ) en todos los casos fue 0,05. Por convenio, hemos utilizado los siguientes símbolos para indicar gráficamente el valor de  $P$ , tanto en las comparaciones intra e intergrupos:

\*\* Diferencia muy significativa si  $P < 0,01$

\* Diferencia significativa si  $P < 0,05$

$\tau$  Tendencia a la diferencia significativa si  $P$  pertenece al intervalo 0,05-0,1

Los valores estadísticos son indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Todos los análisis estadísticos se hicieron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA), y las representaciones gráficas mediante el software SigmaPlot 11.1 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

## **IV. RESULTADOS**

---





## RESULTADOS

### **1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA (PMBSF)**

#### **1.1. ACTIVIDAD METABÓLICA: INTENSIDAD DE REACCIÓN CyO**

##### *OBJETIVOS 1.1 y 2.1*

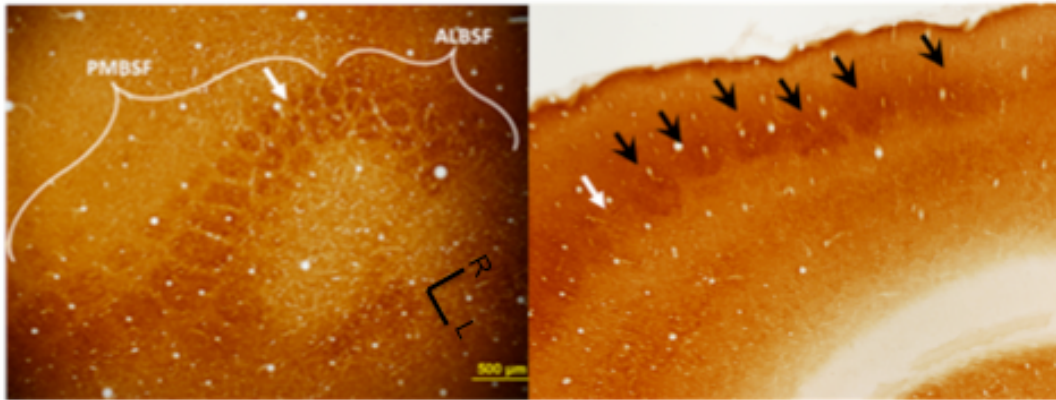
Las estimaciones de este estudio dependieron críticamente de la correcta delimitación de la región diana, la corteza somatosensorial correspondiente a los bigotes del animal o subcampo posteromedial de la corteza de *barriles* (PMBSF). Por la disposición morfológica de las columnas corticales (ver Antecedentes), el PMBSF fue visto casi en su totalidad en cortes tangenciales reaccionados para CyO, diferenciándose claramente de otros subcampos (Fig. 10 -izquierda). Nuestro estudio lo realizamos sobre cortes horizontales, para evitar la variabilidad en el ángulo de corte tangencial. Con ayuda de las secciones tangenciales establecimos unos criterios básicos para la correcta delimitación del PMBSF sobre cortes horizontales. Los límites caudal, dorsal y ventral del PMBSF fueron identificados con facilidad. Sin embargo, el límite rostral era menos obvio debido a la transición suave entre los *barriles* más rostrales del PMBSF y los pequeños-medianos *barriles* del subcampo anterolateral (ALBSF, correspondientes a senos pilosos no vibrisiales situados sobre labio y otras regiones faciales; Fig. 10 -izquierda).

Para abarcar completamente el PMBSF (capas I-IV), identificamos como la sección más rostral sobre cortes horizontales, aquella con pequeños *barriles* y septo que fuera inmediatamente anterior a la sección en la que, al menos, dos grandes *barriles* con un amplio septo pudieron ser reconocidos (que fue tomada como la primera para el recuento; Fig. 10 -derecha).

En el PMBSF reaccionado para CyO pudieron observarse claramente las diferencias de intensidad entre capas corticales. La zona de mayor intensidad, indicando una mayor actividad metabólica funcional, correspondió a la zona de capa IIIp/IV. En esta capa pudimos distinguir las unidades anatómicas correspondientes a los *barriles* (teñidas muy intensamente; Fig. 11A, asterisco negro) de las zonas de separación *interbarril*, o septos, de baja intensidad. La capa de menor intensidad de neuropilo CyO fue la II/III.

En los animales C, las mediciones de DO sobre el total del PMBSF revelaron que no existía diferencia significativa en la intensidad CyO entre los hemisferios derecho e

izquierdo (diferencia interhemisférica de  $6 \pm 1\%$ ,  $P = 0,11$ ). El análisis por capas mostró que en capa II existía una asimetría significativa, siendo el hemisferio derecho un  $8 \pm 1\%$  mayor que el izquierdo ( $P = 0,02$ ). Este resultado, sin embargo, no se obtuvo en el análisis de capa IV cortical, donde la diferencia interhemisférica fue de  $4 \pm 1\%$  ( $P = 0,54$ ).



**Fig. 10.** Delimitación del PMBSF sobre cortes horizontales. **Izquierda)** Sección tangencial reaccionada para CyO mostrando los *barriles* pertenecientes a las vibrisas mistaciales (PMBSF) y a los senos pilosos no vibrisiales (ALBSF). La flecha blanca marca la transición entre ambas subregiones. **Derecha)** Sección horizontal reaccionada para CyO. La flecha blanca indica el mismo lugar de la sección tangencial, septo que separa los subcampos subcampo ALBSF y PMBSF (flechas negras), respectivamente. Orientación: Rostral es izquierda, Lateral es arriba. Barra horizontal 500  $\mu\text{m}$ .

La amputación o desaferentización crónica del IoN provocó una significativa caída en la intensidad CyO del neuropilo en el hemisferio afectado (contralateral), sobre todo en capa IV ( $-7 \pm 3$ ,  $P = 0,02$ ) y en el conjunto del PMBSF ( $-9 \pm 4$ ,  $P = 0,04$ ). La capa II/III del hemisferio afectado también disminuyó considerablemente respecto al hemisferio intacto, mostrando una tendencia estadística a la significación ( $-9 \pm 5$ ,  $P = 0,06$ ).

La estimulación artificial del IoN amputado tuvo efectos sobre la corteza desaferentizada, evitando la caída en la intensidad detectada en el grupo A. En el grupo S, nos encontramos que tanto el PMBSF en conjunto como las capas II/III y IV por separado no mostraron diferencia interhemisférica significativa, con un valor máximo del 3% de diferencia entre hemisferios (diferencia interhemisférica de  $2 \pm 3\%$ ,  $3 \pm 2\%$

y  $1 \pm 3\%$  con  $P = 0,94$ ,  $P = 0,81$  y  $P = 0,89$  para PMBSF, capa II/III y capa IV, respectivamente).

Las comparaciones intergrupo mostraron que la amputación provocaba una asimetría interhemisférica, con una intensidad muy reducida en el hemisferio contralateral, significativamente diferente a la detectada en animales intactos o C (comparación C-A:  $P = 0,02$ ,  $P = 0,04$  y  $P < 0,01$  para PMBSF, capa II/III y capa IV, respectivamente). La estimulación del nervio normalizó los valores, no encontrándose diferencias en la actividad CyO entre los animales S y C, para ninguna capa cortical estudiada (comparación S-C:  $P = 0,54$ ,  $P = 0,44$  y  $P = 0,73$  para PMBSF, capa II/III y capa IV, respectivamente). Esto indica que la estimulación mantuvo la actividad metabólica funcional, de forma similar a la de los animales intactos, evitando además la caída detectada tras la amputación. Este efecto fue especialmente notable en capa IV, donde los valores obtenidos para el grupo A y el grupo S fueron significativamente diferentes (comparación A-S:  $P = 0,08$ ,  $P = 0,12$  y  $P = 0,03$  para PMBSF, capa II/III y capa IV, respectivamente).

Todos los datos numéricos medios de la variable *Intensidad de neuropilo CyO* están indicados en la Tabla 5. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 11A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig 12B.

**Tabla 5. Actividad metabólica cortical**

	Capas II/III			Capa IV			PMBSF total		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)
<b>C</b>	78 ± 10	83 ± 11	8 ± 1	94 ± 12	98 ± 11	4 ± 1	86 ± 11	90 ± 11	6 ± 1
<b>A</b>	86 ± 11	77 ± 12	-9 ± 5	100 ± 12	93 ± 12	-7 ± 3	94 ± 11	85 ± 12	-9 ± 4
<b>S</b>	80 ± 10	81 ± 10	1 ± 3	92 ± 9	94 ± 9	3 ± 2	86 ± 9	87 ± 9	2 ± 3

**Tabla 5.** Valores medios de DO del neuropilo CyO para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S) en los hemisferios *ipsi* (*il*, no afectado) y *contralateral* (*cl*, afectado). Se indican los valores de las capas II/III y capa IV por separado, así como los del PMBSF considerado en su conjunto. *cl/il* (%) representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico. Los valores son dados en unidades relativas de la DO media ± SEM de la distribución.

## 1.2. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN CORTICAL

### OBJETIVOS 1.2 y 2.2

Las estimaciones de volumen en los animales C mostraron que en condiciones normales, sin manipulación periférica, no existe asimetría entre hemisferios para esta variable. El porcentaje medio interhemisférico fue de  $-0,1 \pm 0,4\%$  para el PMBSF en su conjunto ( $P = 0,83$ ), y de  $-0,7 \pm 0,8\%$  para la capa IV ( $P = 0,36$ ). En la capa II/III se observó una cierta tendencia a la significación, siendo el hemisferio derecho un  $0,7 \pm 0,3\%$  más grande que el izquierdo ( $P = 0,06$ ).

La amputación del nervio periférico conllevó una disminución significativa en el volumen de la corteza somatosensorial desaferentizada. En el análisis del PMBSF, en conjunto, se observó una caída de volumen, de aproximadamente un 10%, en el hemisferio contralateral a la lesión ( $-9,9 \pm 1,7$ ,  $P < 0.01$ ). Este efecto fue especialmente notable para la capa IV, donde se observó un descenso aprox. de -15% ( $-15,3 \pm 1,5\%$ ,  $P < 0.01$ ). La capa II/III del hemisferio afectado también disminuyó tras la amputación, aunque de forma estadísticamente no significativa ( $-3,3 \pm 2,7\%$ ,  $P = 0,28$ ).

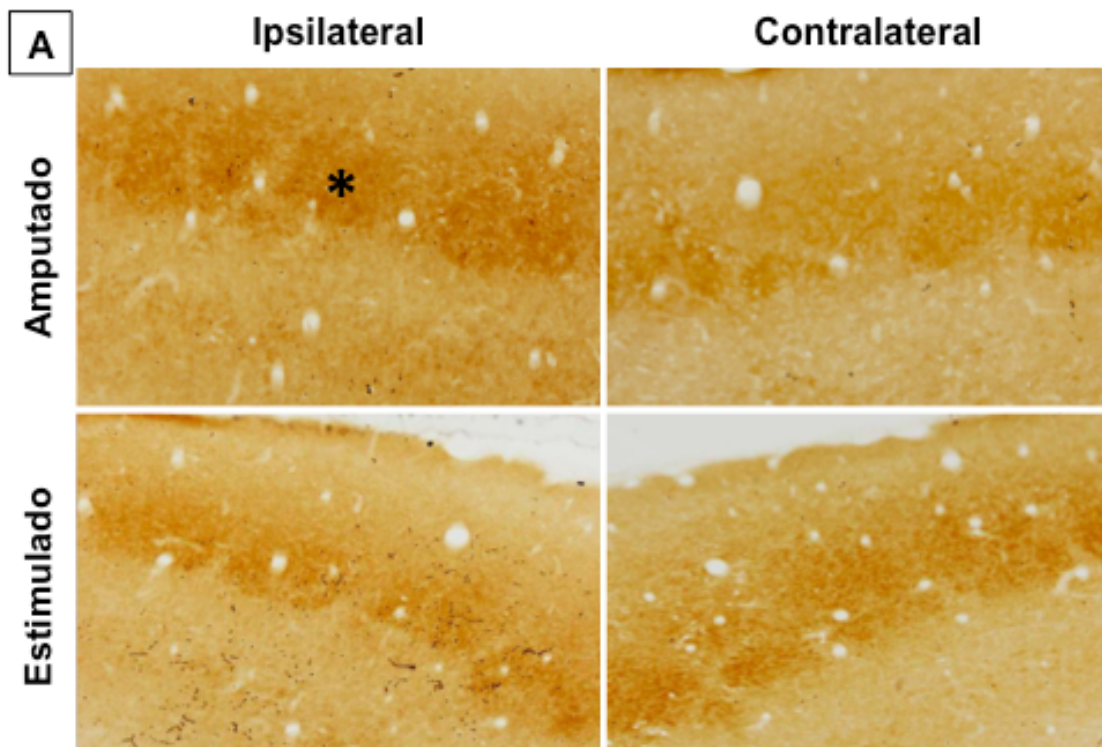
Los resultados obtenidos para el grupo S mostraron que la estimulación neuroprotésica evitaba el descenso de volumen cortical subsiguiente a la amputación en todas las áreas corticales estudiadas. No encontramos ninguna diferencia

**Tabla 6. Estimación de volumen cortical**

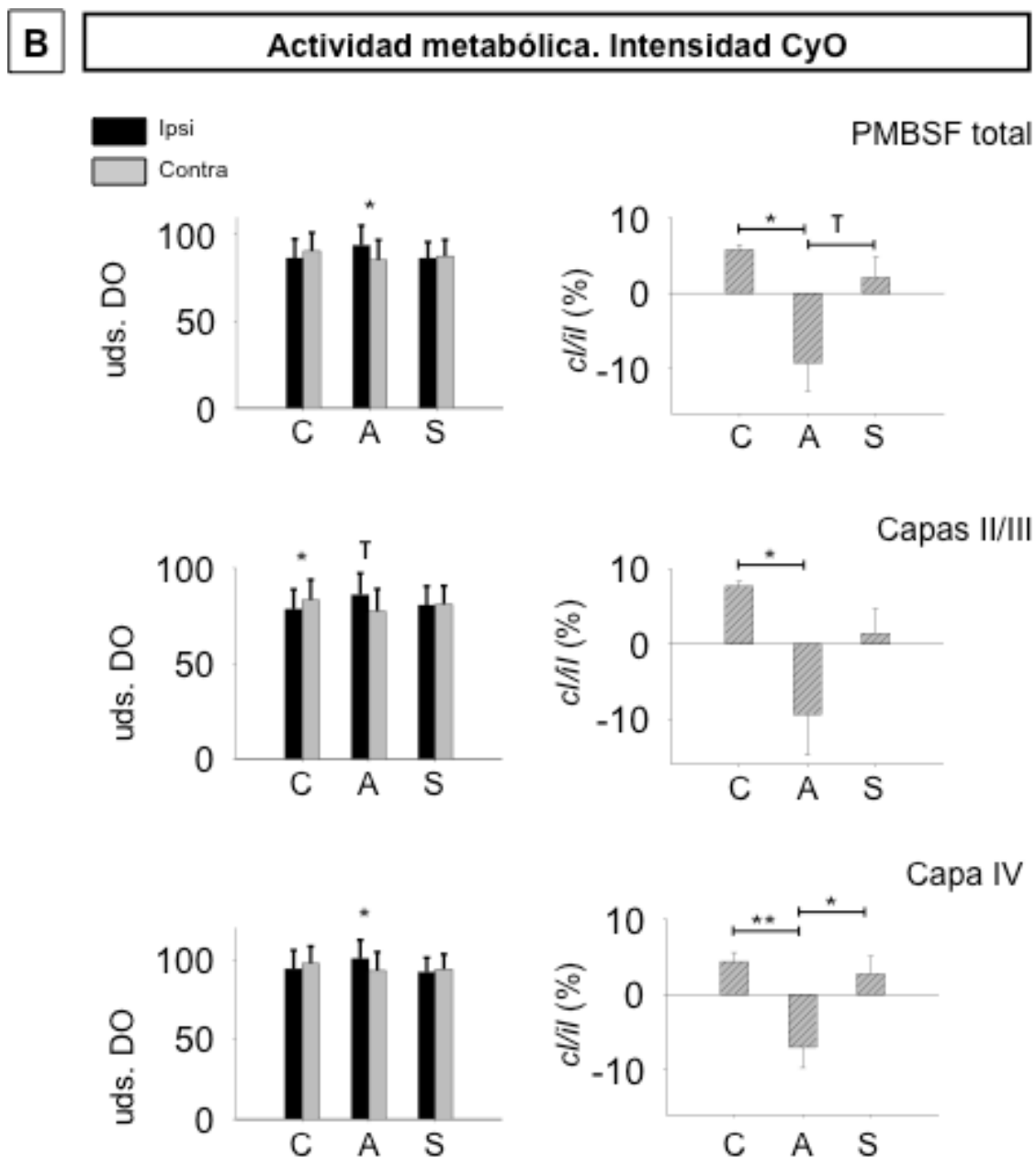
	Capas II/III			Capa IV			PMBSF total		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il (%)</i>	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il (%)</i>	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il (%)</i>
<b>C</b>	$2,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$-0,7 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$-0,1 \pm 0,4$
<b>A</b>	$1,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$-3,3 \pm 2,7$	$2,2 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$-15,3 \pm 1,5$	$4,0 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$	$-9,9 \pm 1,7$
<b>S</b>	$2,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 1,8$	$1,9 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 1,5$	$3,9 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$0,7 \pm 1,5$

**Tabla 6.** Valores medios de volumen cortical, en  $\text{mm}^3$ , para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S) en los hemisferios *ipsi* (*il*, no afectado) y *contralateral* (*cl*, afectado). Se indican los valores de las capas II/III y capa IV por separado, así como los del PMBSF considerado en su conjunto. *cl/il (%)* representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico. Los valores son dados en estimación de volumen medio  $\pm$  SEM de la distribución.

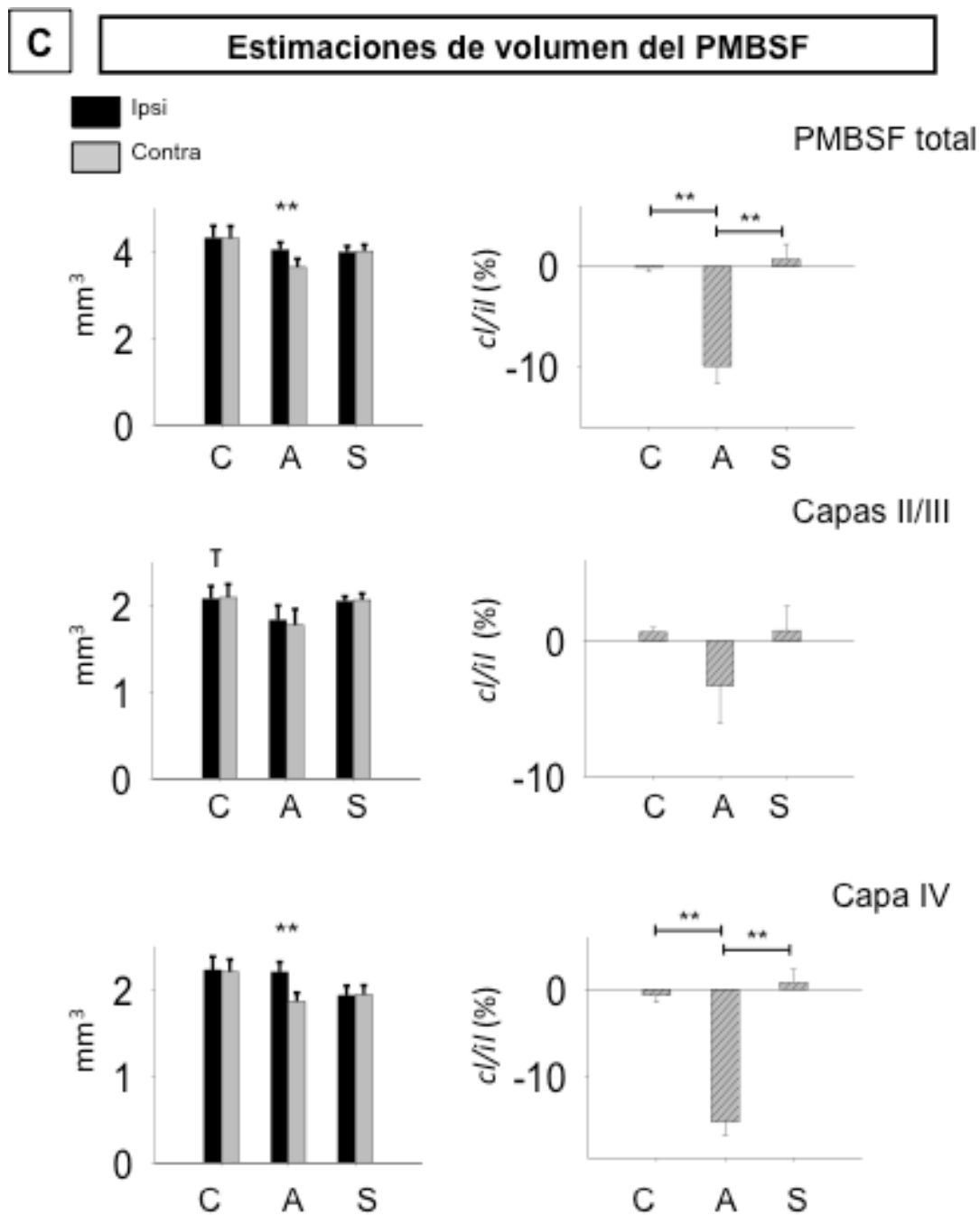
interhemisférica significativa en este grupo, siendo del  $0,7 \pm 1,5\%$  ( $P = 0,67$ ) para el PMBSF en su conjunto,  $0,8 \pm 1,8\%$  ( $P = 0,68$ ) para las capas II/III, y de  $0,8 \pm 1,5\%$  ( $P = 0,71$ ) para capa IV.



**Fig. 11. A.** Microfotografías de secciones horizontales reaccionadas para CyO, mostrando los *barriles* del PMBSF (asterisco negro). Para cada grupo experimental (eje lateral, Amputado en fila superior y Estimulado fila inferior) se muestran secciones de los hemisferios ipsi (no afectado) y contralateral (afectado). Orientación: en los hemisferios ipsilaterales, rostral está a la derecha, y en los hemisferios contralaterales, rostral está a la izquierda. Lateral está arriba. Barra horizontal 500  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 11. B.** Estimación de la actividad metabólica, por mediciones de densidad óptica (DO), de la corteza de *barriles* en los animales control (C), amputados (A) y estimulados (S). Izquierda. Representación de la intensidad media de la reacción CyO, en unidades arbitrarias de DO, de las capas II/III (fila superior), capa IV (fila media), y PMBSF (considerado en su conjunto) de los hemisferios ipsi (*il*, gris) y contralateral (*cl*, negro), según grupo experimental. Derecha. Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico ( $cl / il$  (%)) para la actividad metabólica en cada estructura y grupo experimental. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución.



**Fig. 11. C.** Estimación de volumen, en  $\text{mm}^3$ , de la corteza de *barriles* en los animales control (C), amputados (A) y estimulados (S). Izquierda. Representación del volumen medio, en  $\text{mm}^3$  de las capas II/III (fila superior), capa IV (fila media), y PMBSF (considerado en su conjunto) de los hemisferios ipsi (*il*, gris) y contralateral (*cl*, negro), según grupo experimental. Derecha. Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico (*cl/il* (%)) para el volumen en cada estructura y grupo experimental. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución.



Los análisis intergrupo mostraron que las diferencias en el porcentaje de cambio interhemisférico entre los grupos C, A y S estaban principalmente en capa IV y en el PMBSF en su conjunto. La relación de volumen contra/ipsilateral del grupo A era significativamente diferente a la encontrada para los grupos C y S, respectivamente ( $P < 0,01$  para A-C y A-S, tanto en PMBSF como en capa IV). La relación interhemisférica de volumen para la capa II/III no mostró diferencias entre los grupos ( $P = 0,20$  para comparación A-C y  $P = 0,24$  para comparación A-S). Los grupos C y S mostraron relaciones interhemisféricas similares sin diferencia significativa en ninguna de las áreas estudiadas (comparación C-S:  $P = 0,62$ ,  $P = 0,95$  y  $P = 0,62$  para PMBSF, capa II/III y capa IV, respectivamente).

Todos los datos numéricos medios de la variable Estimación de Volumen están indicados en la Tabla 6. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 11A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig 11C.

### 1.3. CIRCUITOS INHIBITORIOS. POBLACIONES DE INTERNEURONAS GABA-ÉRGICAS

#### OBJETIVOS 1.3 y 2.3

##### 1.3.1. Cuantificación de interneuronas PV-positivas

Las neuronas inmunopositivas a PV se localizaron tanto en las capas supragranulares como en la capa granular. La mayor densidad la encontramos en capa IV, siguiendo un patrón similar al de los parches de CyO. El neuropilo cortical también reaccionó intensamente a la PV. La inmunorreactividad neuronal se localizó fundamentalmente en el soma y dendritas, con núcleos muy teñidos. Todas las neuronas observadas tenían una morfología no piramidal, con dendritas orientadas en todos los ejes (Fig. 12A).

La unidad de recuento fue el citoplasma neuronal. Las neuronas tomadas como positivas fueron aquellas con núcleo intensamente teñido y, al menos, cuatro dendritas inmunomarcadas en cualquiera de los planos de su eje z (Fig. 12A, detalle).

Las estimaciones del número total de neuronas PV-positivas en la corteza de *barriles* de animales intactos mostraron que no existía diferencia significativa entre el PMBSF de los hemisferios derecho e izquierdo, con un porcentaje de cambio medio de  $2 \pm 2\%$  ( $P = 0,33$ ). El número de interneuronas PV-positivas en capa IV fue muy similar entre

los dos hemisferios, con una relación porcentual de  $1 \pm 2\%$  ( $P = 0,73$ ). En la capa II/III se observó una relación ligeramente mayor, siendo el número de interneuronas PV-positivas un  $4 \pm 1\%$  mayor en el hemisferio derecho ( $P = 0,09$ ).

La amputación del nervio periférico tuvo un efecto devastador en el número de neuronas PV-positivas del hemisferio afectado (contralateral). Para todas las regiones se observó una disminución significativa de esta población tras la desaferentización. Concretamente, en el total del PMBSF se observó una caída del  $-19 \pm 1\%$  ( $P < 0,01$ ), en capas II/III la disminución fue del  $-22 \pm 4\%$  ( $P < 0,01$ ), y en la capa IV del  $-18 \pm 2\%$  ( $P = 0,02$ ).

La situación detectada en el grupo A fue completamente prevenida por la aplicación de estimulación neuroprotésica sobre el nervio. El número de interneuronas PV-positivas en el hemisferio contralateral del grupo S no varió significativamente del detectado en el ipsilateral. En el total del PMBSF encontramos una relación interhemisférica del  $0 \pm 1\%$  ( $P = 0,97$ ), en capas II/III del  $-1 \pm 4\%$  ( $P = 0,40$ ), y en capa IV del  $1 \pm 1\%$  ( $P = 0,44$ ).

Las comparaciones intergrupo revelaron que la relación interhemisférica del número de neuronas PV-positivas del grupo A era significativamente muy diferente a la relación del grupo C y del grupo S, respectivamente ( $P < 0,01$  para todos los casos y todas las capas). El porcentaje de cambio en la N de interneuronas PV-positivas entre los hemisferios contra e ipsilateral de los grupos C y S no mostró ninguna diferencia (comparación C-S:  $P = 0,33$ ,  $P = 0,33$ ,  $P = 0,96$  para PMBSF en conjunto, capas II/III y capa IV, respectivamente)

Todos los datos numéricos medios de la variable *número de interneuronas PV-positivas* están indicados en la Tabla 7. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 13A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig 13B.

**Tabla 7. Estimación del número total de interneuronas corticales PV-positivas**

	Capas II/III			Capa IV			PMBSF total		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)
<b>C</b>	3314 ± 42	3439 ± 81	4 ± 1	5892 ± 327	5938 ± 220	1 ± 2	9207 ± 341	9377 ± 251	2 ± 2
<b>A</b>	3376 ± 142	2640 ± 190	-22 ± 4	5922 ± 130	4878 ± 221	-18 ± 2	9298 ± 255	7518 ± 318	-19 ± 1
<b>S</b>	3361 ± 174	3310 ± 92	-1 ± 4	5966 ± 86	6020 ± 137	1 ± 1	9326 ± 200	9330 ± 161	0 ± 1

**Tabla 7.** Valores medios del número total (N) de interneuronas PV-positivas en la corteza de *barriles* para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S), en los hemisferios *ipsi* (*il*, no afectado) y *contralateral* (*cl*, afectado). Se indican los valores de N de las capas II/III y capa IV por separado, así como los del PMBSF considerado en su conjunto. *cl/il* (%) representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico. Los valores son dados como número  $N \pm \text{SEM}$  de la distribución.

### 1.3.2. Cuantificación de interneuronas CB-positivas

La inmunoexpresión de CB en la corteza somatosensorial mostró un neuropilo reactivo parcheado (o no uniforme en su positividad) y neuronas positivas distribuidas por todas las capas, con intensidades de tinción variables. La mayor densidad de CB-inmunoexpresión fue detectada en las capas supragranulares (Fig. 12B). El recuento se hizo sólo de aquellas con i) citoplasma intensamente teñido, ii) al menos, una gran dendrita orientada en el eje perpendicular a la superficie pial, y iii) al menos dos dendritas horizontales (Fig. 12B, detalle).

La población de neuronas CB-positivas en los animales C fue muy similar en los hemisferios derecho e izquierdo, con relaciones porcentuales del  $0 \pm 1\%$  para el PMBSF ( $P = 0,90$ ) y para las capas II/III ( $P = 0,98$ ), y del  $1 \pm 2\%$  para la capa IV ( $P = 0,84$ ).

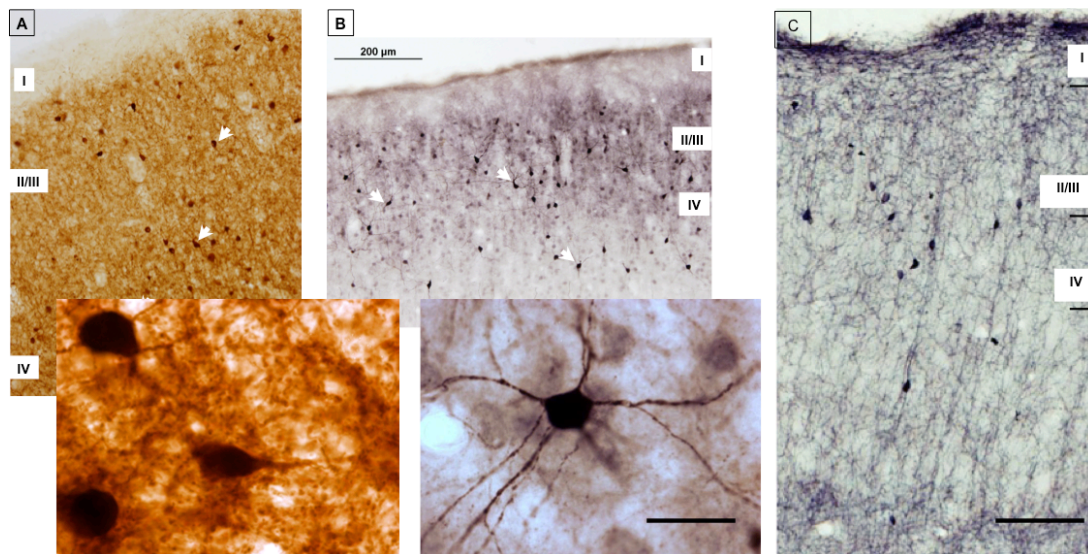
La amputación del IoN afectó especialmente a las interneuronas CB-positivas de capas II/III, provocando una disminución del  $-16 \pm 2\%$  en el hemisferio contralateral ( $P < 0,01$ ). En la capa IV también se detectó una caída de esta población,  $-6 \pm 9\%$ , aunque

no arrojó significación estadística ( $P = 0,57$ ). En el conjunto del PMBSF obtuvimos un porcentaje de cambio medio del  $-13 \pm 4$  ( $P = 0,06$ ).

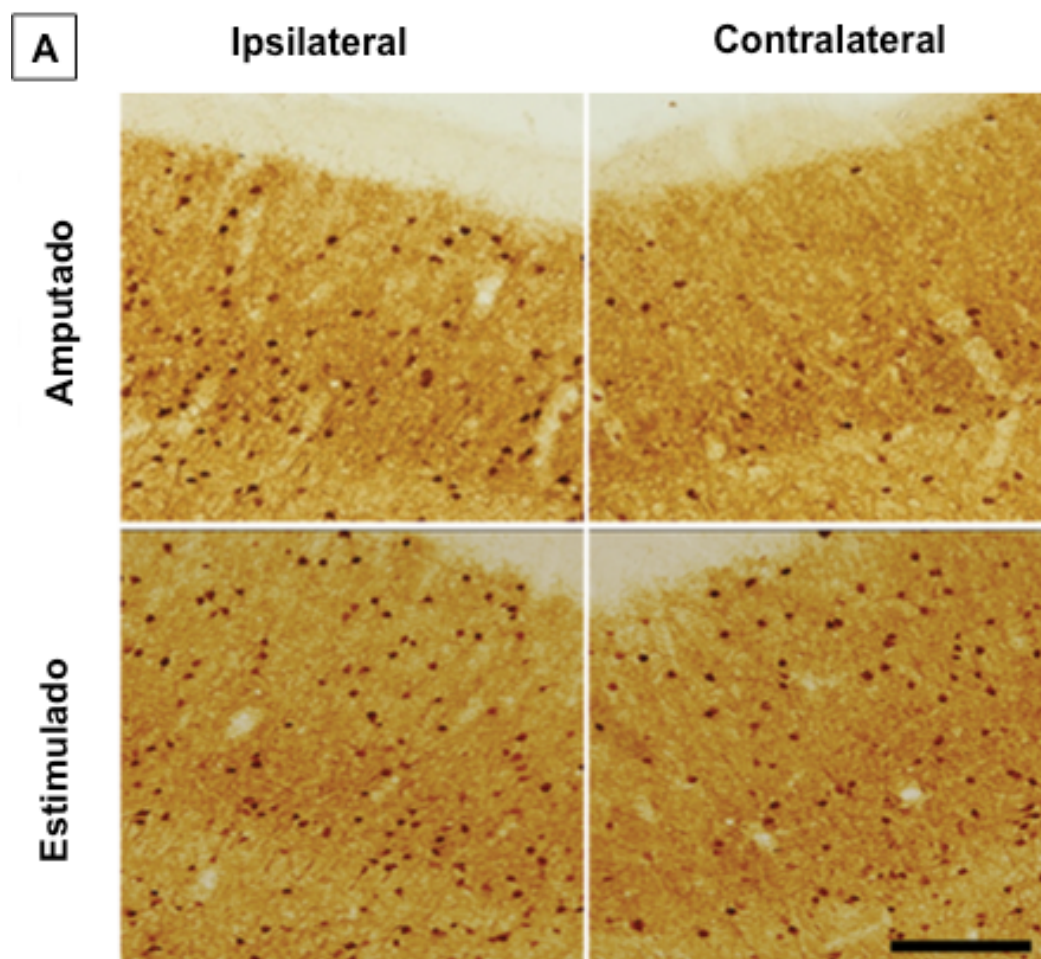
La aplicación de estimulación artificial evitó la disminución de interneuronas inmunopositivas a CB en todas las capas de la corteza desaferentizada. Los valores obtenidos para la relación porcentual interhemisférica fueron de  $1 \pm 1\%$  para el PMBSF ( $P = 0,36$ ),  $-1 \pm 2\%$  para las capas II/III ( $P = 0,62$ ), y  $4 \pm 1\%$  para la capa IV ( $P = 0,06$ ; nótese incluso la tendencia en esta región, con un mayor número de interneuronas CB-positivas en el hemisferio contralateral).

Las comparaciones intergrupo mostraron que las manipulaciones periféricas afectaron especialmente a la población de IN CB-positivas de capas II/III y PMBSF en conjunto. La relación interhemisférica de esta variable en el grupo C mostró diferencias significativas a la encontrada en el grupo A para estas dos zonas (comparación C-A:  $P < 0,01$  para PMBSF y capas II/III). Sin embargo, el análisis en capa IV para los grupos C y A no evidenció una diferencia significativa ( $P = 0,5$ ). Una situación similar se obtuvo al comparar los grupos A y S. El efecto preventivo de la estimulación sobre la población de IN CB-positivas fue especialmente notable en capas II/III y PMBSF (comparación A-S:  $P < 0,01$  para PMBSF y capas II/III,  $P = 0,3$  para capa IV). El número de IN inmunopositivas a CB en el hemisferio contra, en relación al ipsilateral, del grupo S en todas las áreas estudiadas es muy similar al encontrado para el grupo C (comparación C-S:  $P = 0,55$  para PMBSF,  $P = 0,65$  para capas II/III,  $P = 0,11$  para capa IV).

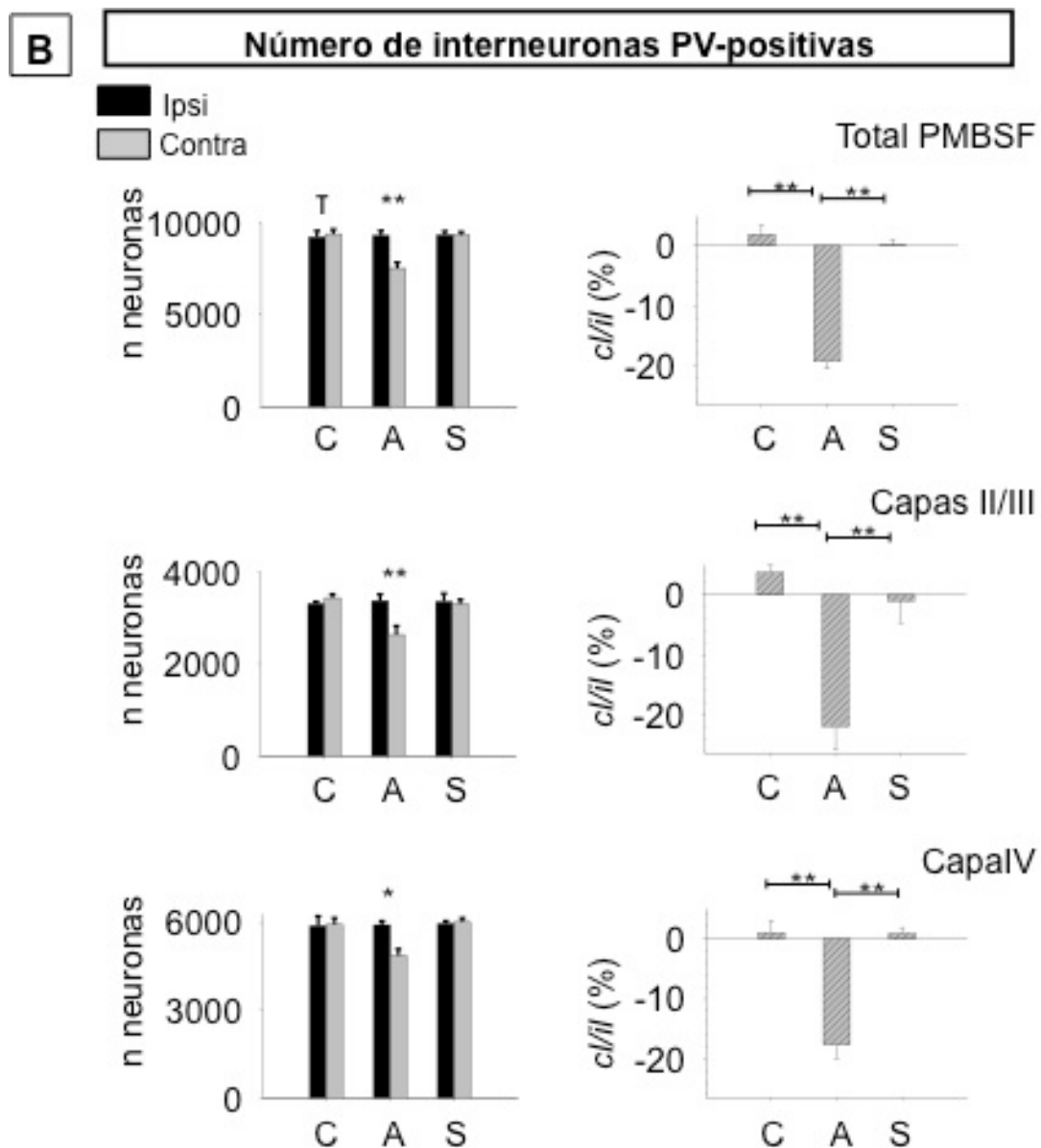
Todos los datos numéricos medios de la variable *número de interneuronas CB-positivas* están indicados en la Tabla 8. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 14A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig. 14B.



**Fig. 12.** Fotomicrografías de secciones horizontales, abarcando el PMBSF, reaccionadas para distintos marcadores inmunohistoquímicos. **A)** Inmunoeexpresión de PV. **D)** Detalle de interneuronas PV-positivas de capa cortical IV. **B)** Inmunoeexpresión de CB. **E)** Detalle de interneuronas CB-positivas de capa cortical II/III. Flechas blancas indican el tipo de neuronas tomadas como positivas para el recuento. Barra horizontal 200 µm para A y B, 20 µm para D y E. **C)** Inmunoeexpresión de ChAT en la corteza *de barriles*. Barra horizontal 100 µm. Se indican las divisiones de capas corticales para mostrar la distribución laminar del inmunomarcado. Orientación: R está a la izquierda, L está arriba.

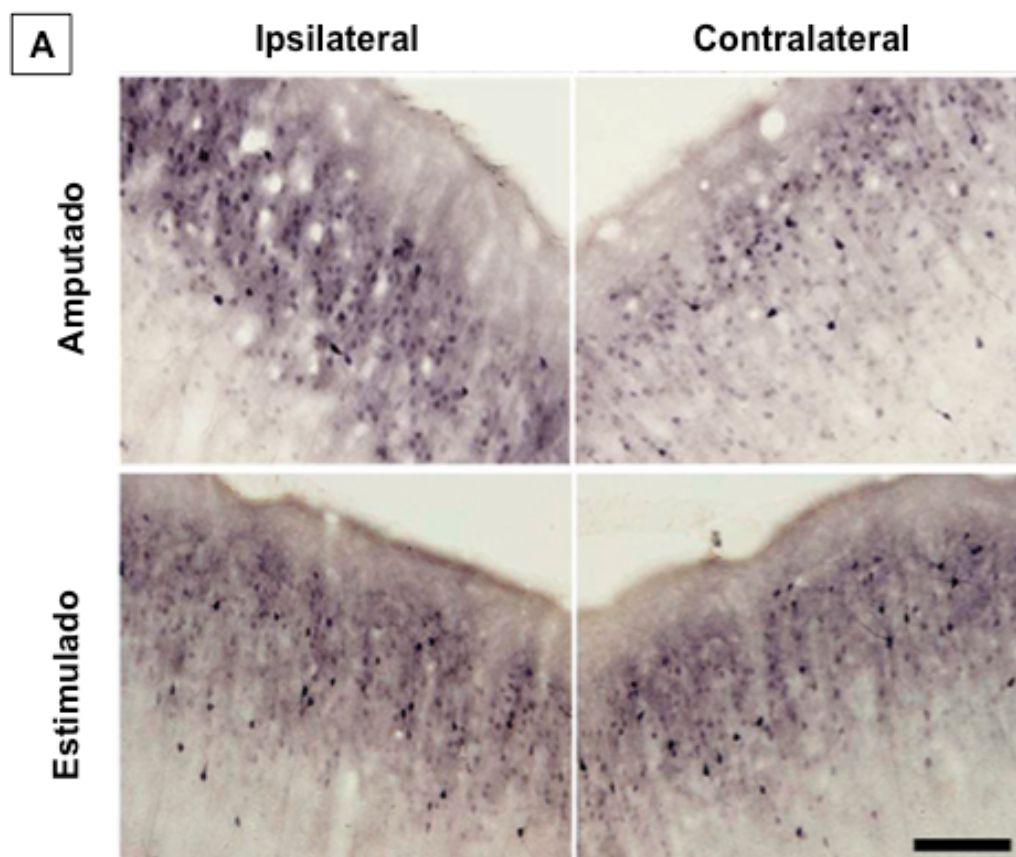


**Fig. 13. A.** Fotomicrografías de baja magnificación del inmunomarcado para PV, abarcando la zona anatómica del PMBSF, en animales Amputados (fila superior) y Estimulados (fila inferior). Se muestran los hemisferios ipsi y contralateral de la misma sección horizontal. Orientación: en hemisferios ipsilaterales R está a la derecha; en los hemisferios contralaterales R está a la izquierda. L está arriba. Barra horizontal 200  $\mu$ m.



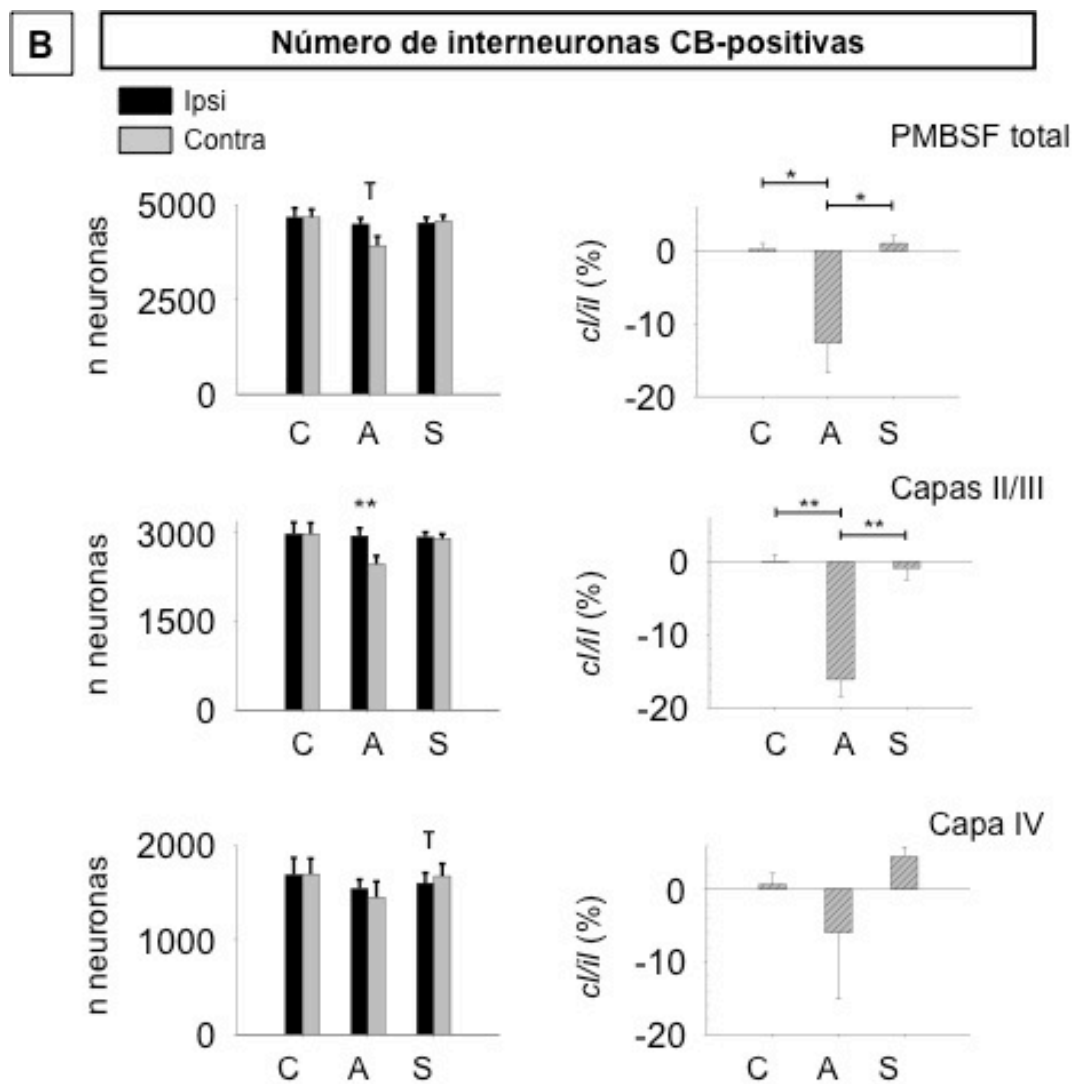
**Fig. 13. B.** Representación gráfica del número total de interneuronas PV-positivas en la corteza de *barriles* de animales control (C), amputados (A) y estimulados (S). Izquierda. Representación del número de neuronas inmunopositivas a PV en las capas II/III (fila superior), capa IV (fila media) y PMBSF (considerado en su conjunto) de los hemisferios ipsi (gris) y contralateral (negro), según grupo experimental. Derecha. Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico para en cada estructura y grupo experimental. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución.





**Fig. 14. A.** Fotomicrogrfías de baja magnificación del inmunomarcado para CB, abarcando la zona anatómica del PMBSF, en animales Amputados (fila superior) y Estimulados (fila inferior). Se muestran los hemisferios ipsi y contralateral de la misma sección horizontal. Orientación: en hemisferios ipsilaterales R está a la derecha; en los hemisferios contralaterales R está a la izquierda. L está arriba. Barra horizontal 200  $\mu$ m.





**Fig. 14. B.** Representación gráfica del número total de interneuronas CB-positivas en el campo de *barriles* de animales control (C), amputados (A) y estimulados (S). Izquierda. Representación del número de neuronas inmunopositivas a CB en las capas II/III (fila superior), capa IV (fila media), y PMBSF (considerado en su conjunto) de los hemisferios ipsi (gris) y contralateral (negro), según grupo experimental. Derecha. Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico en cada estructura y grupo experimental. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución.

**Tabla 8. Estimación del número total de interneuronas corticales CB-positivas**

	Capas II/III			Capa IV			PMBSF total		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)
<b>C</b>	2981 ± 195	2980 ± 186	0 ± 1	1691 ± 178	1698 ± 164	1 ± 2	4672 ± 247	4678 ± 209	0 ± 1
<b>A</b>	2947 ± 133	2472 ± 138	-16 ± 2	1545 ± 95	1452 ± 167	-6 ± 9	4492 ± 166	3925 ± 246	-13 ± 4
<b>S</b>	2927 ± 82	2901 ± 79	-1 ± 2	1601 ± 109	1676 ± 131	4 ± 1	4528 ± 143	4577 ± 146	1 ± 1

**Tabla 8.** Valores medios del número total (N) de interneuronas CB-positivas en la corteza de *barriles* para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S), en los hemisferios *ipsi* (*il*, no afectado) y *contralateral* (*cl*, afectado). Se indican los valores de N de las capas II/III y capa IV por separado, así como los del PMBSF considerado en su conjunto. *cl/il* (%) representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico. Los valores son dados como número N ± SEM de la distribución.

#### 1.4. INERVACIÓN COLINÉRGICA. INTENSIDAD DE NEUROPILO CHAT-POSITIVO

##### OBJETIVOS 1.4 y 2.4

La inmunohistoquímica para ChAT reveló fibras corticales positivas en todas las capas (y algunos somas neuronales, sobre todo en capas II/III), dispuestas como un entramado de componentes finos y homogéneamente distribuidos. El neuropilo ChAT-positivo siguió un patrón laminar, con la mayor densidad detectada en las capas supragranulares, vs. una menor en capas IIp y IV (Fig. 12 C).

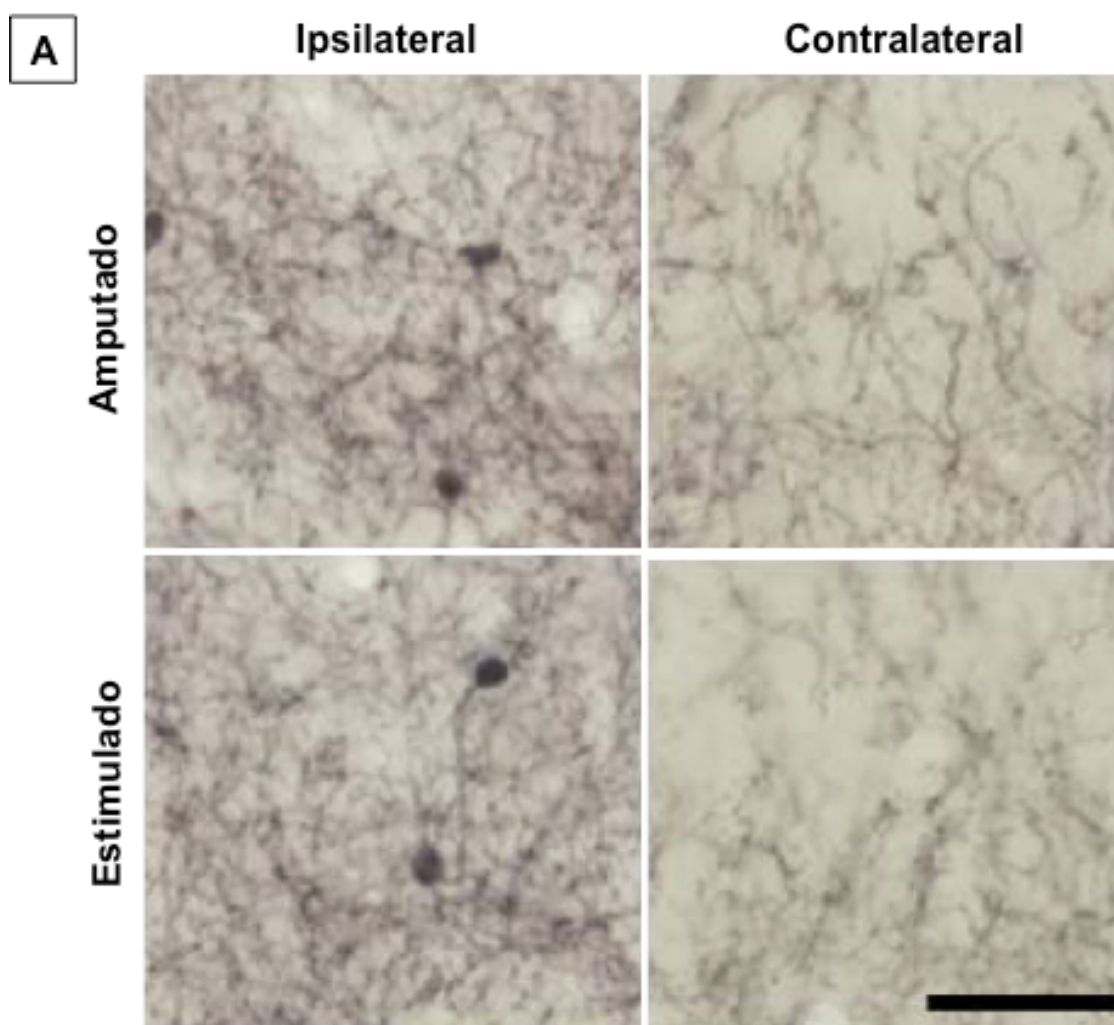
Las mediciones de DO en los animales C mostraron que la intensidad de neuropilo colinérgico en los hemisferios derecho e izquierdo era muy similar en todas las regiones estudiadas. Esta relación interhemisférica tomó valores de  $2 \pm 3\%$  en el PMBSF global ( $P = 0,73$ ),  $1 \pm 4\%$  para las capas II/III ( $P = 0,88$ ) y  $3 \pm 3\%$  en capa IV ( $P = 0,58$ ).

La amputación de nervio periférico provocó una significativa disminución del neuropilo ChAT-positivo en todas las regiones del hemisferio afectado. Esta caída fue

del  $-18 \pm 3\%$  en PMBSF ( $P = 0,03$ ), del  $-17 \pm 2\%$  en capas II/III ( $P = 0.04$ ) y del  $-20 \pm 4\%$  en capa IV ( $P = 0.04$ ).

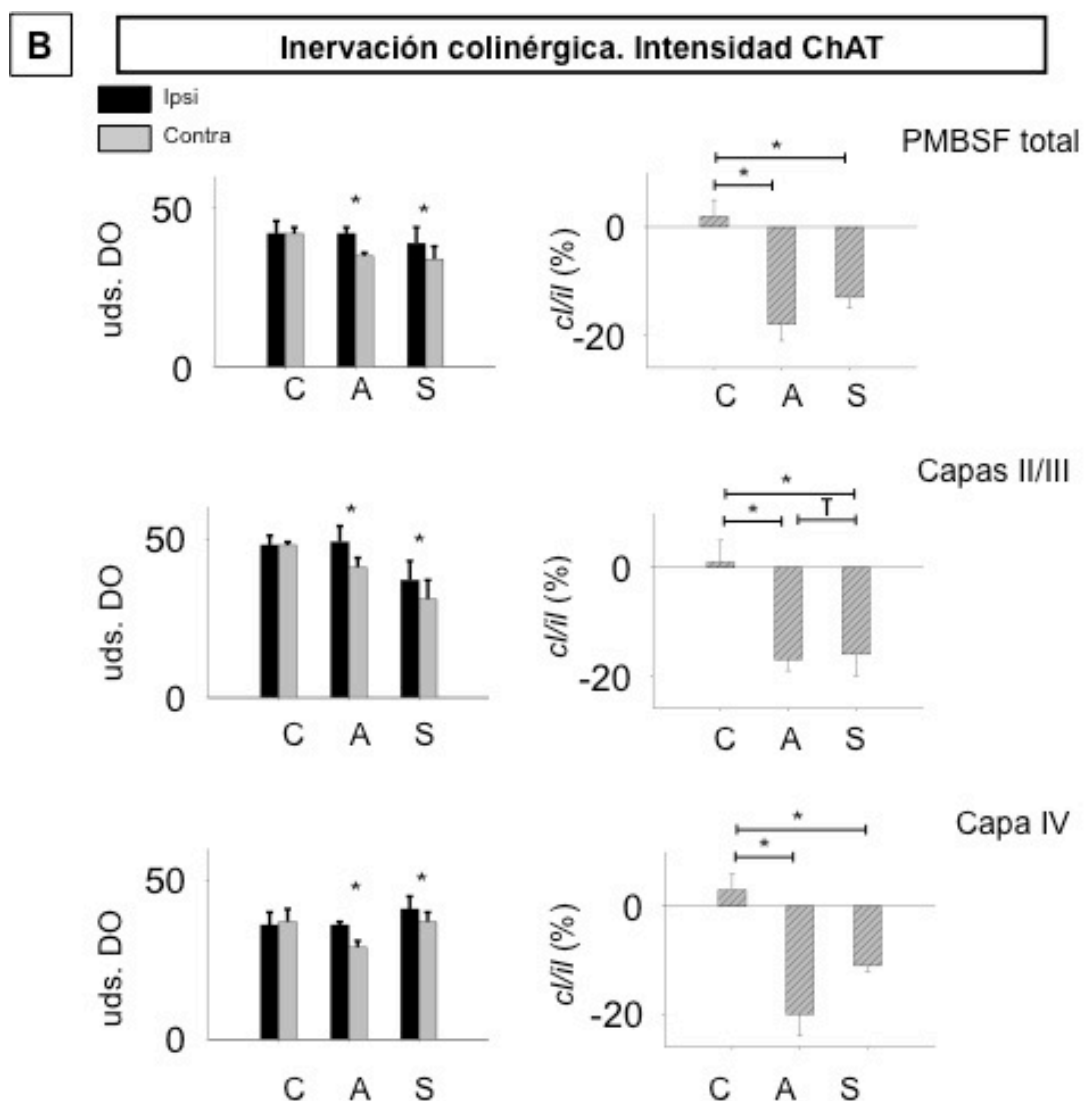
El análisis de los animales estimulados fue muy similar al encontrado en los amputados, con diferencias significativas en la inervación colinérgica entre los hemisferios contra e ipsilateral a la lesión. Es decir, la estimulación no evitó el descenso en el neuropilo colinérgico provocado por la amputación. En la corteza desaferentizada del grupo S, el PMBSF mostró una disminución de intensidad para ChAT del  $-13 \pm 2\%$  ( $P = 0,03$ ), en capas II/III el descenso fue de  $-16 \pm 4$  ( $P = 0,03$ ), y en capa IV de  $-11 \pm 1\%$  ( $P = 0,03$ ), respecto a la corteza no afectada.

El análisis intergrupo corroboró que el descenso de inervación colinérgica en la corteza desaferentizada tras amputación era similar al encontrado tras la aplicación de estimulación artificial, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (comparación D-S:  $P = 0,26$ ,  $P = 0,09$ ,  $P = 0,53$  para PMBSF, capas II/III y capa IV, respectivamente. Nótese cierta tendencia a la significación en las capas II/III). El porcentaje de cambio interhemisférico detectado en los grupos A y S fue significativamente diferente al de los animales intactos (comparación A-C:  $0,05 < P > 0,01$  para todas las regiones; comparación S-C:  $P = 0,02$ ,  $P = 0,03$ ,  $P = 0,02$  para PMBSF, capas II/III y capa IV, respectivamente).



**Fig. 15. A.** Microfotografías de alta magnificación de secciones horizontales reaccionadas para ChAT, mostrando el neuropilo colinérgico del campo de *barriles* (capa supragranular). Para cada grupo experimental (eje lateral, Amputado en fila superior y Estimulado fila inferior) se muestran secciones de los hemisferios ipsi (no afectado) y contralateral (afectado). Orientación: en los hemisferios ipsilaterales, Rostral está a la derecha, y en los hemisferios contralaterales, Rostral está a la izquierda. Lateral está arriba. Barra horizontal 50  $\mu$ m

Todos los datos numéricos medios de la variable *inervación colinérgica* están indicados en la Tabla 9. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 15A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig 15B.



**Fig. 15. B.** Representaciones gráficas de los valores de DO del neuropilo colinérgico del campo de *barriles*, medidos sobre secciones inmunomarcadas para ChAT. Izquierda. Representación de la intensidad media en los hemisferios ipsi (*il*, gris) y contralateral (*cl*, negro), según grupo experimental. Derecha. Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico para la inervación colinérgica en cada estructura y grupo experimental. Los valores son dados para las capas corticales II/III y IV, por separado, así como para el PMBSF considerado en su conjunto. C: control, A: amputación, S: estimulación. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P < 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución.

**Tabla 9. Inervación colinérgica cortical**

	Capas II/III			Capa IV			PMBSF total		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il</i> (%)
<b>C</b>	48 ± 3	48 ± 1	1 ± 4	36 ± 4	37 ± 4	3 ± 3	42 ± 4	42 ± 2	2 ± 3
<b>A</b>	49 ± 5	41 ± 3	-17 ± 2	36 ± 1	29 ± 2	-20 ± 4	42 ± 2	35 ± 1	-18 ± 3
<b>S</b>	37 ± 6	31 ± 6	-16 ± 4	41 ± 4	37 ± 3	-11 ± 1	39 ± 5	34 ± 4	-13 ± 2

**Tabla 9.** Valores medios de DO del neuropilo inmunopositivo a ChAT para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S) en los hemisferios *ipsi* (*il*, no afectado) y *contralateral* (*cl*, afectado). Se indican los valores de las capas II/III y capa IV por separado, así como los del PMBSF considerado en su conjunto. *cl/il* (%) representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico. Los valores son dados en unidades relativas de la DO media ± SEM de la distribución.

## 1.5. ACTIVIDAD FUNCIONAL. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

### OBJETIVOS 1.5 y 2.5

El estudio electrofisiológico nos permitió evaluar la actividad funcional de la corteza de *barriles* de los tres grupos experimentales, mediante el análisis de los potenciales evocados (PEs). Teniendo en cuenta que los PEs representan la respuestas corticales a estimulaciones periféricas de la vía somatosensorial, y que los animales A y S habían sufrido la sección irreversible del nervio, la estimulación natural de las vibrisas fue sustituida por la estimulación eléctrica del IoN intacto (nervio, animales C) o del cabo proximal del IoN amputado (neuroma, animales A y S). En los animales C se recogieron, además, los PEs tras la estimulación mecánica de vibrisas con pulsos de aire comprimido.

En total se analizaron 44 registros: 8 de animales C, 8 de animales A y 7 de animales S para intensidad 2x y 7 registros de cada grupo para intensidad 5x (Fig. 16A, B). El patrón de los PEs en todos los animales se caracterizó por la presencia de un primer componente positivo (p1), de muy baja amplitud, seguido por un componente negativo (n1) que dio paso a un segundo componente positivo más largo (p2), de mayor amplitud

que p1 pero menor que n (Fig. 16A). Los componentes N y P estuvieron presentes en todos los animales A y S.

Para el estudio de los registros, comparamos la latencia de aparición de la onda N (lat en Fig. 17A), y el área debajo de la onda N (área azul en Fig. 16A) para estimulaciones con una intensidad de 2 y 5 veces la corriente de estimulación mínima. En el análisis estadístico (ver Fig. 16C para representaciones gráficas) consideramos dos factores de ANOVA: grupo animal e intensidad de la estimulación. Ambos factores mostraron diferencias significativas tanto para la latencia ( $P = 0,0002$  para el factor grupo animal,  $P = 0,0118$  para el factor intensidad) como para el área bajo la curva de N ( $P < 10^{-4}$  para el factor grupo animal,  $P = 0,0037$  para el factor intensidad).

Para intensidad 2x, la latencia de los animales C, A y S fue de  $8,04 \pm 1,98$  ms,  $10,69 \pm 2,16$  ms y  $8,46 \pm 0,95$  ms, respectivamente. Las diferencias significativas se encontraron entre los grupos Control y Amputado ( $P = 0,002$ ), y Amputado – Estimulado ( $P = 0,011$ ). No se obtuvo diferencia significativa para la latencia a 2x entre los grupos Control y Estimulado ( $P = 0,616$ ). En el análisis del área, los valores a 2x fueron de  $191,38 \pm 83,93$  msXmV,  $43,88 \pm 57,93$  msXmV y  $122,43 \pm 69,46$  msXmV para los grupos C, A y S, respectivamente. Las comparaciones a posteriori determinaron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos C y A ( $P = 0,0007$ ), pero no entre C y S ( $P = 0,11$ ). Entre los grupos A y S se detectó una tendencia a la significación ( $P = 0,06$ ).

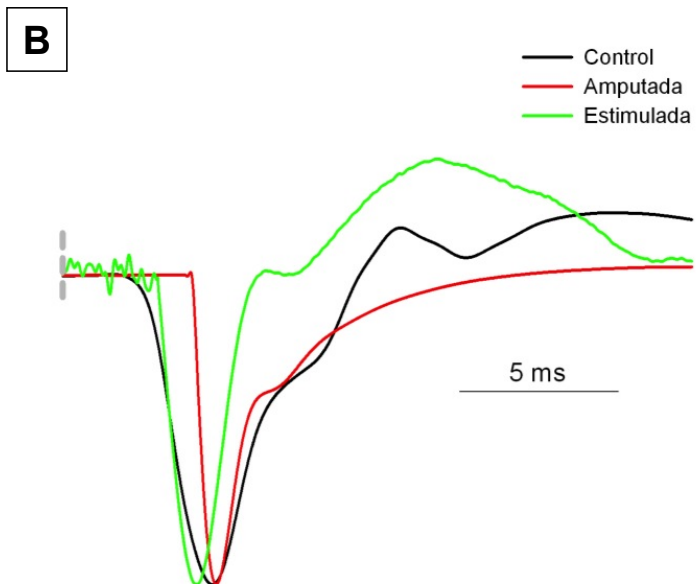
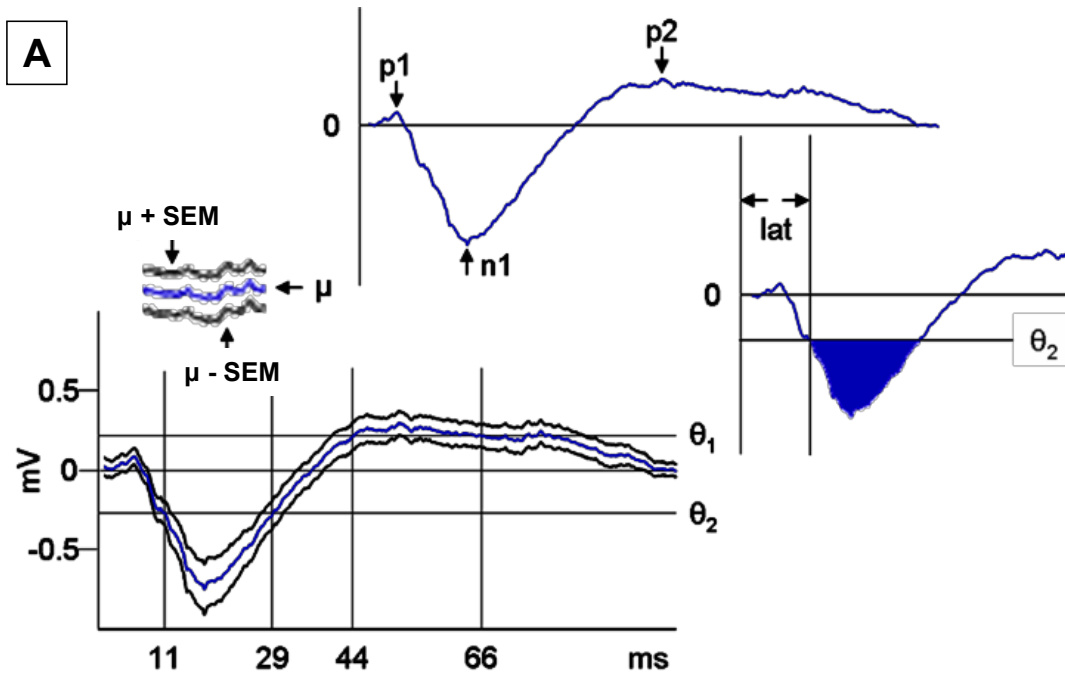
Para intensidad 5x, la latencia de los animales C, A y S fue de  $6,97 \pm 0,86$  ms,  $8,89 \pm 1,15$  ms y  $7,87 \pm 1,04$  ms, respectivamente. Los contrastes *a posteriori* mostraron que sólo existía diferencia significativa entre los grupos C y A ( $P = 0,019$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos A y S ( $P = 0,24$ ) o C y S ( $P = 0,22$ ). Los valores de área para intensidad 5x fueron  $251,00 \pm 60,73$  msXmV,  $88,57 \pm 86,06$  msXmV y  $192,43 \pm 83,87$  msXmV para los animales C, A y S respectivamente. Los contrastes *a posteriori* mostraron que la amputación provocaba una disminución significativa del área bajo la curva N, con respecto tanto a la situación Control ( $P = 0,0005$ ) como tras la Estimulación ( $P = 0,02$ ). No se obtuvo diferencia entre los grupos C y S ( $P = 0,18$ ).

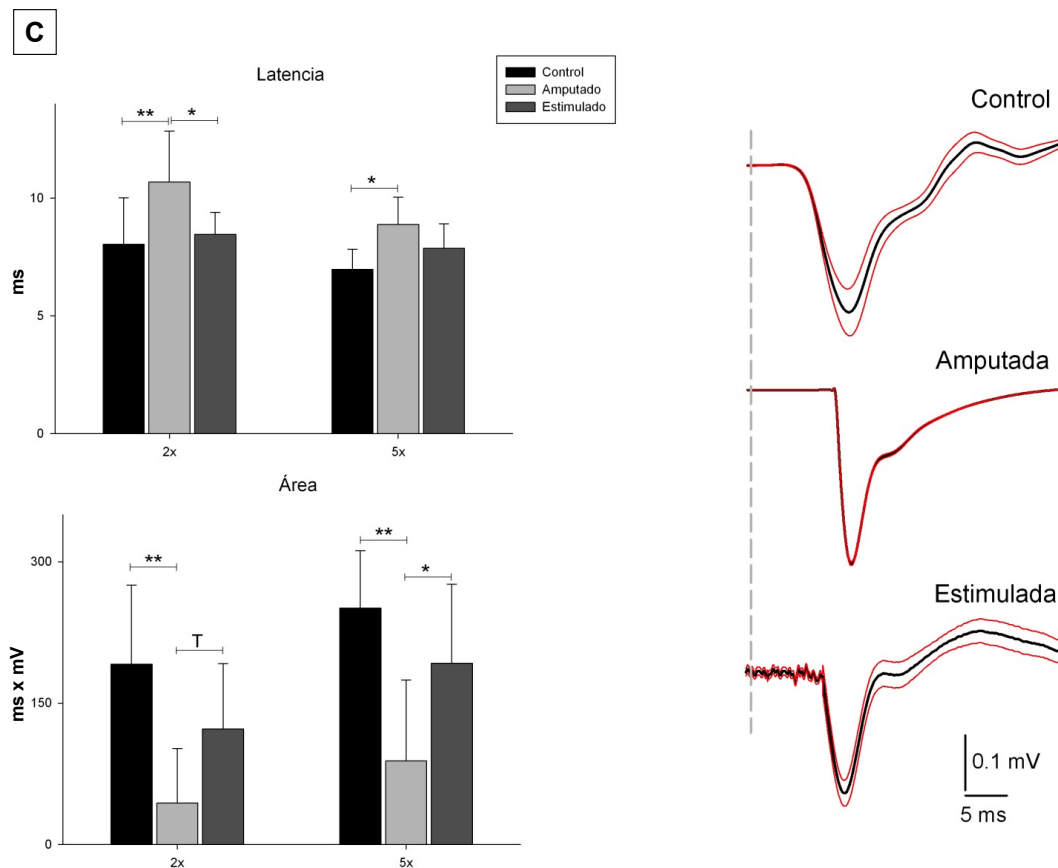
Los resultados mostraron que al aumentar la intensidad de corriente de 2x a 5x, en general se observó una disminución en la latencia de todos los grupos y un aumento del

área bajo la curva N. Esta variación, en función de la corriente, sólo mostró ser estadísticamente significativa para la latencia dentro del grupo Amputado ( $P = 0,036$ ). Los valores para el área dentro del grupo A fueron similares entre 2x y 5x ( $P = 0,288$ ). En el caso del grupo C, no se obtuvo diferencia ni en la latencia ni el área con el aumento de la corriente ( $P = 0,143$  y  $P = 0,158$ , respectivamente). Análogamente al grupo Control, en los animales Estimulados los valores de latencia y área fueron estadísticamente similares para las dos intensidades ( $P = 0,498$  y  $P = 0,110$ , respectivamente).

En los animales C, las respuestas corticales a los estímulos mecánicos aplicados sobre las vibrisas (pulsos de aire comprimido) se caracterizaron por PEs de dos ondas principales, que aparecieron con una latencia de 1,5 a 4,0 ms.



**Actividad funcional. Potenciales Evocados**



**Fig. 16.** Potenciales evocados registrados en la corteza tras la estimulación periférica. **A)** PE típico de un animal Control, tras estimulación eléctrica del IoN con pulsos de 200  $\mu$ s, mostrando el valor medio  $\mu$  (línea azul) y los SEMs (líneas negras) de 25 registros. Los umbrales  $\phi_1$  y  $\phi_2$  se situaron en el valor máximo y mínimo de  $\mu \pm \text{SEM}$  (detalle izquierdo) en los 200 ms antes de la aparición del estímulo. Las variables que consideramos en los análisis fueron la latencia de aparición de la onda N (lat en detalle derecha) y el área bajo la curva de N (área sombreada en azul en detalle derecha). **B)** Superposición de los potenciales medios de los tres grupos experimentales, normalizados respecto a su variación máxima. Puede observarse cómo la latencia del potencial evocado en los animales control y estimulado es similar, mientras que aumenta en el animal amputado. También se observa cómo el área del componente negativo se reduce en el animal amputado respecto del control, mientras que el valor de dicho área en el animal estimulado es intermedio a ambos. **C)** Izquierda. Representaciones gráficas de los valores medios de latencia (en ms, arriba) y área (en ms x mV, inferior) obtenidos en los registros corticales de los animales C (barra negra), A (barra gris claro) y S (barra gris oscuro) tras estimulación eléctrica de IoN/neuroma a intensidades 2x (izquierda) y 5x (derecha) la intensidad mínima para lo que se obtuvo respuesta cortical. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución. Derecha. Potenciales medios evocados por la estimulación eléctrica del IoN en animales Control, Amputados y Estimulados. La línea negra en cada caso indica el valor promedio de voltaje obtenido a partir de 50 estímulos

mientras que las líneas rojas indican el error estándar en cada punto de muestreo. La línea discontinua vertical indica el comienzo del estímulo eléctrico.

## **2. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LAS ESTRUCTURAS TRIGEMINALES SUBCORTICALES**

### **2.1. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN DE VPM**

#### **OBJETIVO 3.1**

La estimación de volumen del núcleo talámico VPM se hizo sobre secciones horizontales reaccionadas para CyO. En estas secciones, los *barriloides* aparecen perpendiculares al eje longitudinal (Fig. 17A, flechas blancas). La delimitación lateral de VPM fue relativamente sencilla, tomando como referencia el núcleo reticular talámico y el núcleo ventral postero-lateral (VPL) inmediatamente lateral a VPM. El límite medial fue menos evidente debido a la difícil delimitación exacta del núcleo POM. Ayudándonos siempre de las delimitaciones topografiadas por Paxinos (Paxinos and Watson, 1998) sobre cortes horizontales, el volumen del núcleo VPM fue estimado en su extensión dorso-ventral (Interaural, 4,90 mm límite dorsal; 3,40 mm límite ventral) considerando la mayor intensidad de la reacción CyO en la zona de *barriloides* (Fig. 18A).

La estimación de volumen de VPM en animales intactos o C reveló no diferencias asimétricas significativas entre hemisferios, siendo el lado contralateral o derecho un  $4 \pm 3\%$  mayor que el ipsilateral o izquierdo ( $P = 0,33$ ). La amputación provocó una disminución en el volumen del VPM contralateral de  $-9 \pm 4\%$  respecto al VPM no afectado. Este valor, sin embargo, no alcanzó significación estadística, mostrando sólo una tendencia ( $P = 0,08$ ). Los resultados para los animales estimulados evidenciaron que la estimulación artificial redujo la caída en el volumen del VPM afectado, provocando que la diferencia interhemisférica fuera de  $-3 \pm 4\%$  ( $P = 0,11$ ).

Los análisis intergrupo mostraron que la principal diferencia estaba entre la relación de volumen interhemisférica de los animales A y la de los animales C (comparación A-C:  $P = 0,05$ ). Los efectos de la estimulación sobre el volumen de VPM no fueron significativamente distintos a los observados tras amputación (comparación S-A:  $P = 0,25$ ). El porcentaje de cambio de volumen de VPM interhemisférico observado tras

estimulación mostró una tendencia a la significación, con respecto al observado en animales intactos (comparación S-C:  $P = 0,07$ ).

Los datos numéricos medios de la variable *estimación de volumen de VPM* están indicados en la Tabla 11- Izquierda. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 18A. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig. 17C.

## 2.2. ESTIMACIÓN DE VOLUMEN DE Pr5

### OBJETIVO 3.2

La estimación de volumen de Pr5 se hizo sobre secciones horizontales reaccionadas para CyO. En este plano, los *barriletes* pueden apreciarse en su extensión rostrocaudal como fascículos ondulados intensamente reactivos a CyO (Fig. 17B, flechas blancas). La delimitación del núcleo se hizo con ayuda de las secciones adyacentes teñidas con el método de Nissl. El límite lateral de Pr5 no presentó dificultad, al estar marcado por el tracto del trigémino. Los límites medial, rostral y caudal fueron menos obvios y, con el objetivo de considerar toda la extensión del Pr5, seguimos las siguientes pautas. El borde medial del Pr5 lo marcaron, en su extensión rostrocaudal, los fascículos de la raíz motora del trigémino y la salida del VII par craneal (raíz del facial; nivel más caudal). La parte caudal del núcleo se diferenciò por el límite que marcan los grupos celulares más condensados de Pr5 y el núcleo parvicelular reticular del puente, que se encuentra entre el Pr5 y la raíz del facial. Dorsalmente, un estrecho espacio, escaso de células, marcó la separación entre el Pr5 y la parte ventrolateral del complejo parabraquial, incluyendo el núcleo de Kölliker-Fuse. Dorsomedialmente, el núcleo supratrigeminal colinda con la división dorsal del Pr5, pero como las células del primero son más grandes y oscuras se pudo distinguir fácilmente el límite entre ellos.

La estimación de volumen de Pr5 en los animales C mostró que no existía asimetría significativa entre lados, siendo el izquierdo un  $3 \pm 3\%$  mayor que el derecho ( $P = 0,51$ ). La amputación del nervio provocó un importante descenso en el volumen del Pr5 ipsilateral (Fig. 18B y 18C, fila superior) haciendo que la diferencia interhemisférica tomara un valor de  $-16 \pm 7\%$  ( $P = 0,03$ ). La estimulación artificial del nervio seccionado redujo el valor de esta caída a un  $-7 \pm 4\%$  (Fig. 18C, fila inferior), haciendo que la diferencia entre lados no fuera estadísticamente significativa ( $P = 0,14$ ).

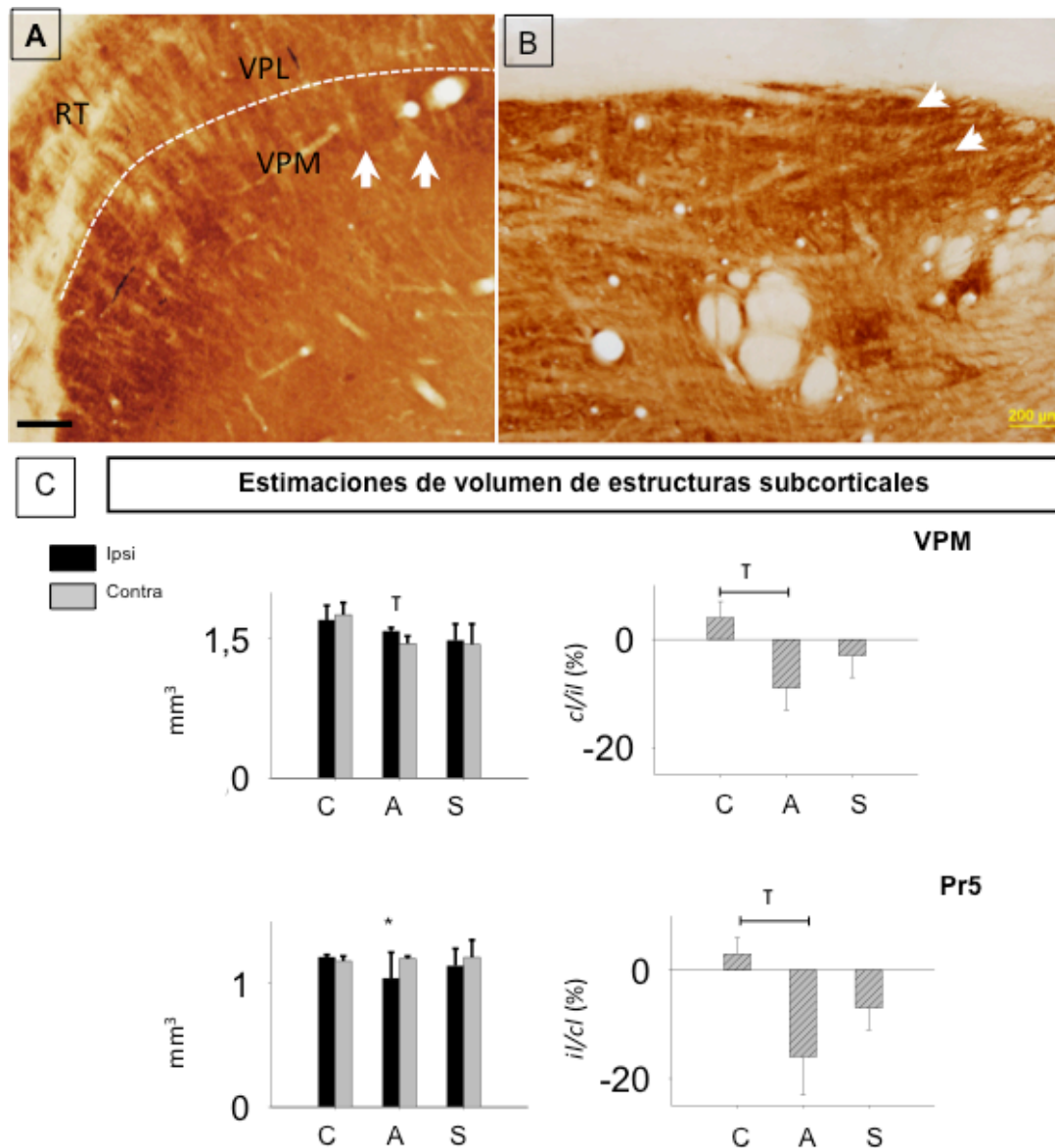
**Tabla 11. Estimación de volumen de estructuras subcorticales**

	VPM			Pr5		
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>cl/il (%)</i>	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>il/cl (%)</i>
<b>C</b>	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	4 ± 3	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	3 ± 3
<b>A</b>	1,6 ± 0,0	1,4 ± 0,1	-9 ± 4	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	-16 ± 7
<b>S</b>	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	-3 ± 4	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	-7 ± 4

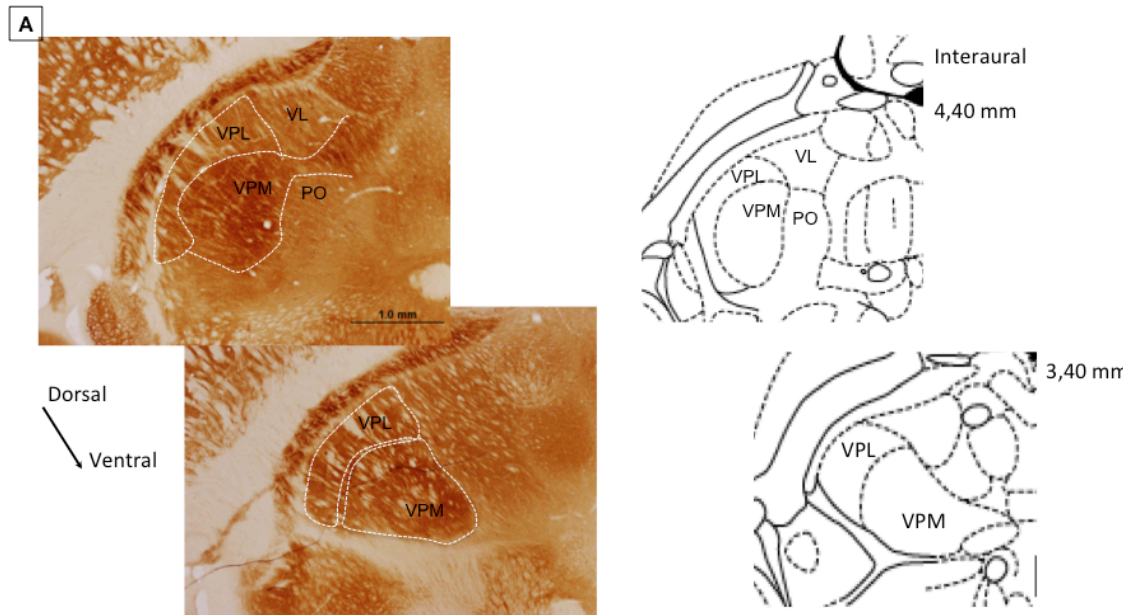
**Tabla 11.** Valores medios de volumen cortical, en mm<sup>3</sup>, de los núcleos VPM (izquierda) y Pr5 (derecha) para animales control (C), amputados (A) y estimulados (S) en los hemisferios *ipsi* y *contralateral*. *cl/il (%)* o *il/cl (%)* representa el porcentaje de cambio medio interhemisférico del hemisferio afectado vs. hemisferio no afectado. Los valores son dados en estimación de volumen medio ± SEM de la distribución.

Las comparaciones intergrupo revelaron que las principales diferencias estaban entre el porcentaje de cambio de volumen de los animales amputados respecto al de los animales intactos (C-A:  $P = 0,05$ ). Para el resto de comparaciones, A-S y C-S, no se alcanzó el nivel de significación ( $P = 0,11$ ,  $P = 0,12$ , respectivamente).

Todos los datos numéricos medios de la variable *estimación de volumen de Pr5* están indicados en la Tabla 11 Derecha. Para fotomicrografías de los principales resultados, ver Fig. 18B y 18C. Las relaciones y representaciones gráficas pueden verse en Fig. 17C.

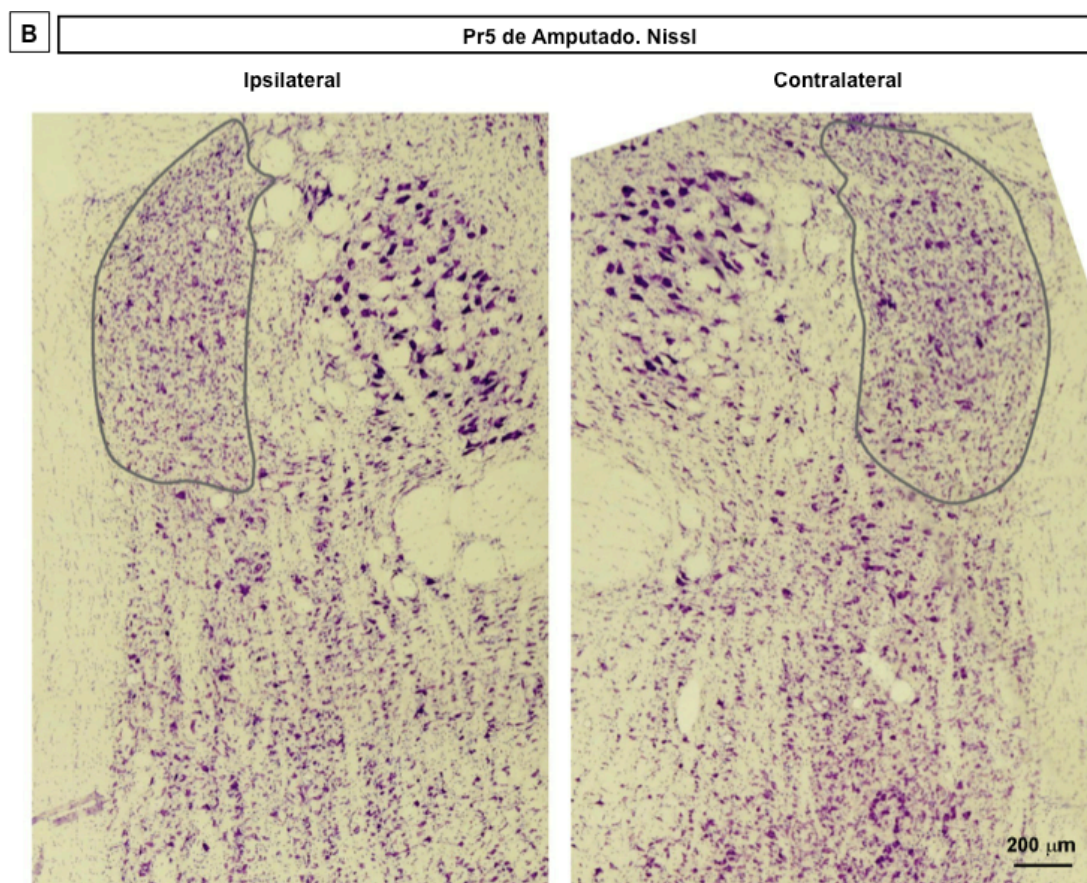


**Fig. 17.** Estimación de volumen de las estructuras subcorticales. **A, B)** Fotomicrografías de secciones horizontales reaccionadas para CyO mostrando la región de VPM (A) y Pr5 (B), respectivamente. Con flechas blancas se indican en A) los *barriloides*, orientados perpendicularmente al eje longitudinal, en B) los *barriletes*, como haces dispuestos a lo largo del eje rostrocaudal. Barra horizontal 200µm. **C)** Izquierda. Representación del volumen medio, en mm<sup>3</sup> de VPM (fila superior) y Pr5 (fila inferior) en los hemisferios ipsi (*il*, gris) y contralateral (*cl*, negro), según grupo experimental. Derecha) Representación gráfica del porcentaje de cambio interhemisférico para el volumen en cada estructura y grupo experimental. C: control, A: amputación, S: estimulación. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; T  $0,1 < P > 0,05$ . Las barras de error representan el SEM de la distribución. VPL: núcleo ventral posterolateral; VPM: núcleo ventral posteromedial; RT: núcleo reticular.



**Fig. 18. A.** Imágenes de secciones horizontales, reaccionadas para CyO (izquierda) y mapeadas según Paxinos (derecha) (Paxinos and Watson, 1998), abarcando la zona talámica del núcleo VPM en dos niveles distintos del eje dorso-ventral. Es posible apreciar las diferencias en la intensidad CyO de la zona correspondiente a los *barriloides* del VPM. Orientación: Lateral es izquierda; Rostral es arriba. Barra horizontal 1,0 mm. VPL: núcleo ventral posterolateral; VPM: núcleo ventral posteromedial; VL: núcleo ventrolateral.

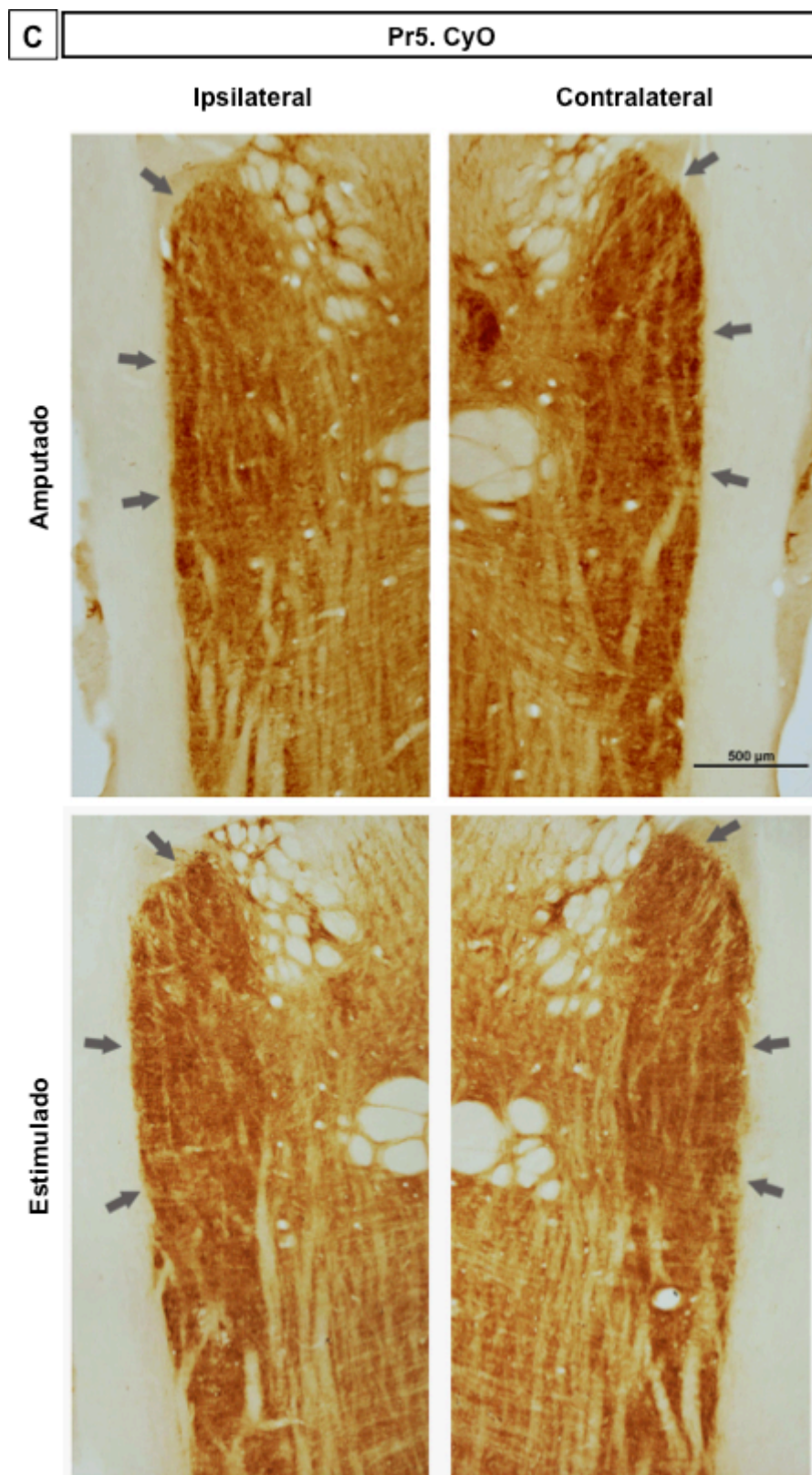




**Fig. 18. B.** Imágenes de secciones horizontales, teñidas con violeta de cresilo según el método de Nissl, abarcando la zona de Pr5 en un animal del grupo Amputado. Se muestran lados ipsilateral (afectado, izquierda) y contralateral (no afectado, derecha) del mismo animal. Además de una reducción en el volumen, es posible apreciar la pérdida de organización en los *barriletes* en el lado ipsilateral. Orientación: Lateral es izquierda para el lado ipsilaterale y derecha para el contralateral. Rostral es arriba. Barra horizontal 200  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 18 C.** Imágenes de secciones horizontales reaccionadas para CyO, abarcando la zona del complejo trigeminal sensorial del trigémino, en tronco. El perfil correspondiente al núcleo Pr5 está delimitado con flechas en los laterales. Los *barriletes* se disponen como haces longitudinales, siguiendo el eje rostrocaudal. Se muestran lado ipsilateral (izquierda) y contralateral (derecha) de animales amputados (fila superior) y estimulados (fila inferior). Obsérvese la relativa difuminación de los perfiles de barriletes en el lado Amputado, con menor intensidad de reacción CyO, fenómenos mucho menos notables en el caso Estimulado. Orientación: Lateral es izquierda para los ipsilaterales y derecha para los contralaterales. Rostral es arriba. Barra horizontal 500  $\mu\text{m}$ .





## **V. DISCUSIÓN**

---



## DISCUSIÓN

### 1. CONSIDERACIONES CIENTÍFICO-TÉCNICAS

#### 1.1. MODELO EXPERIMENTAL

##### SISTEMA SENSORIAL

La **elección del sistema somatosensorial** donde desarrollar nuestro modelo se basó en dos requerimientos: i) *relevancia funcional*, similar a la que tiene la mano en primates, y ii) *correspondencia morfológica* discreta entre los órganos periféricos y las representaciones morfológicas a nivel central. El sistema elegido fue el sistema trigeminal de la rata, concretamente la vía aferente vibrisas-*barriles*. Las vibrisas del animal son un órgano fundamental para la adquisición de información del mundo exterior, con una alta representación en los mapas neurales de la corteza somatosensorial. Además, la organización del sistema es tal que cada una de las vibrisas del animal tiene su correspondiente representación citoarquitectónica en los núcleos centrales. Estas unidades anatomofuncionalmente discretas reciben el nombre de *barrilete* en Pr5, *barriloides* en VPM y *barriles* en SmI (de ahí el nombre de *Corteza de Barriles*; Fig. 4A Izquierda). Cualquier manipulación en una vibrisa individual puede ser estudiada y cuantificada en su correspondiente unidad del SNC (revisado en profundidad en Waite and Tracey, 1995). Por estos motivos, las condiciones experimentales de Amputación -A- y Estimulación -S- se simularon por manipulaciones directas sobre el nervio que lleva la información desde las vibrisas, el nervio infraorbitario (IoN).

##### EDAD DE LOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO

La experimentación se llevó a cabo sobre **animales adultos**, de 4 meses en el momento de intervención. A pesar de ser ampliamente conocido que la plasticidad es mayor en edades tempranas, nuestro modelo trató de simular una situación traumática, amputación y subsiguiente estimulación artificial, que, generalmente, ocurre en etapas más avanzadas de la vida.

En rata, el comienzo del periodo adulto no se ha definido con exactitud (revisado en Fox, 2002). Para distinguir con cierta seguridad el periodo adolescente del adulto, normalmente se considera adolescente al periodo de los meses 1 y 2, cuando el desarrollo de la corteza ya se ha completado, el cuerpo del animal aumenta rápidamente

y alcanzan la madurez sexual. Se considera que los animales están completamente en la edad adulta a partir de los meses 4-6. Esto se corresponde al momento en el que ha pasado el 20-25% de la vida del animal.

#### MODELO DE AMPUTACIÓN.

La condición de **amputación** requería simular la pérdida completa de aferencias sensoriales. Para ello, tras la sección total e irreversible del nervio nos aseguramos de que i) el cabo proximal estuviera aislado del ambiente, mediante tubulización completa en una estructura de silicona, ii) no tuviera lugar cualquier evento propio de la regeneración/reinervación, mediante degeneración mecánica del cabo distal.

En la mayoría de estudios similares en animales, la amputación se alcanza mediante lesiones irreversibles de uno o varios nervios (Garde et al., 2009; Klinke et al., 1999; Panetsos et al., 2008); ver revisión en Micera and Navarro, 2009). Esto, a pesar de no suponer la pérdida completa de miembro, permite, aparte de las obvias consideraciones éticas, evaluar los eventos inducidos por las manipulaciones periféricas de una forma discreta, eliminando variables de ruido.

#### MODELO DE ESTIMULACIÓN

La **recreación de una micro-BMI sensorial** se consiguió por la interfaz directa del nervio seccionado con los electrodos de estimulación. Varios factores nos indican que este sistema funcionó correctamente:

- i) previamente a los registros de PEs, en los animales S se comprobó la evocación de respuesta al aplicar corriente continua sobre los electrodos del implante. De los ocho animales tomados al azar, todos, 8/8, mostraron respuestas corticales ante esta estimulación,
- ii) los resultados obtenidos en los estudios electrofisiológicos muestran que la actividad cortical, tras estimulación eléctrica del neuroma, de los animales S es muy similar a la de los C, y difiere a la de los animales A. Esto sugiere que la ES neuroprotésica ha alcanzado a generar respuestas en las estructuras centrales, manteniendo la excitabilidad y propiedades de respuesta de las neuronas corticales
- iii) los resultados de los análisis morfológicos muestran diferencias cuantitativas entre animales S y A, en variables que reflejan mantenimiento de actividad metabólica y de neurotransmisión.

iii) en el momento de extracción de las muestras para los análisis morfológicos, se extrajeron todos los neuromas correspondientes a los animales A y S. Aunque su análisis detallado no se ha incluido en esta tesis, la simple observación macroscópica mostró claras evidencias en la organización y tamaño de estas estructuras. Las fibras de los neuromas S mostraban un crecimiento mayoritariamente longitudinal, a lo largo del implante. En pocos casos se detectaron abultamientos consistentes que sobrepasaran los límites de la pared del implante de silicona. Sin embargo, en los animales A, alrededor del implante se detectaron acúmulos fibrosos y de deshecho, con fibras neurales encapsuladas. Esto podría sugerir que la respuesta regenerativa se activó en los animales A (probablemente disparada por la ausencia de actividad eléctrica), mientras que en los animales S, los estímulos artificiales evitaron los eventos propios de un sistema amputado.

La estimulación eléctrica de las estructuras periféricas ha sido tradicionalmente utilizada como herramienta neurorrehabilitadora para muchos desórdenes neurológicos y músculo-esqueléticos. La ES se ha utilizado comúnmente para re-educar y facilitar la contracción voluntaria en condiciones neurológicas como ACV o tras lesión de médula espinal. Este tipo de estimulación se conoce como ES neuromuscular o ES funcional (FES). La ES también ha sido extensamente utilizada en el tratamiento de estados crónicos o agudos de dolor. Aquí, la aplicación se conoce como ES transcutánea y el objetivo es activar los sistemas descendentes para el control del dolor y los mecanismos de apertura en la médula espinal (revisado en Rasskazoff and Slavin, 2012). La racionalidad para el uso de la estimulación motora está a nivel del músculo y las motoneuronas. Por ejemplo, la repetición de contracciones musculares derivadas de la ES de nervio periférico aumenta la capacidad oxidativa del músculo y el número de microvasos. Además, la estimulación motora produce impulsos tanto ortodrómicos como antidrómicos, y potencia las sinapsis en el asta ventral, lo que lleva a cambios plásticos en las motoneuronas espinales. A pesar del uso extendido de la ES periférica en la práctica clínica, la mayoría de trabajos científicos se centran en estimulaciones sobre nervios sanos (no lesionados) o en patologías neuromusculares. Sólo recientemente ha empezado el interés en concebir la ES periférica como una potencial herramienta inductora de plasticidad.

Nuestro modelo de ES es completamente novedoso. Aparte de las neuroprótesis cocleares, hasta donde nosotros conocemos, no existen previos modelos animales con este tipo de ES crónica para evaluar los efectos plásticos sobre el SNC desaferentizado.

## PARÁMETROS DE ESTIMULACIÓN

La estimulación se aplicó de forma crónica 12 horas/día, simulando una situación similar a la práctica donde el paciente enciende/apaga el dispositivo según los requerimientos día/noche, durante 4 semanas. El periodo de experimentación, 28 días, se eligió por corresponderse a un modelo a medio plazo. El estudio en humanos más reciente y esperanzador sobre BMIs sensoriales, mantuvo el implante durante 31 días. En nuestro caso, los resultados del estudio a medio plazo avalan la consecución de experimentos a largo plazo, donde el implante se mantenga durante, al menos, 3 meses, que permita estudiar la estabilidad e integración de los estímulos dentro de los mapas corporales del animal.

Los parámetros de estimulación (potencia, tiempo, frecuencia) fueron elegidos de una batería de estudios previos realizados en nuestro laboratorio de la UCM. Estos parámetros (3 V, 20 Hz, 100  $\mu$ s) habían sido previamente utilizados para la estimulación continua del nervio vago de conejos (en colaboración con el *Centro de Cirugía Mínimo Invasiva Jesús Usón* en Cáceres, España) y de ratas, con buenos resultados.

## 1.2. ELECCIÓN DE PARÁMETROS DE ESTUDIO

Las variables anatómicas y funcionales se eligieron por sus implicaciones en los procesos de plasticidad dependiente de actividad.

- *Actividad metabólica:* En las neuronas existe un acoplamiento entre actividad funcional y demanda energética. Tras la activación neuronal, y la consecuente despolarización de membrana, es necesario volver al estado de reposo. La repolarización de la membrana es un proceso dependiente de ATP, necesario para activar la bomba ATPásica de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en contra de gradiente químico y eléctrico. La mayoría del ATP en las neuronas se obtiene del metabolismo oxidativo. En consecuencia, las alteraciones en la actividad entrante (tanto por exceso como por defecto) inducen cambios proporcionales en el metabolismo oxidativo de las neuronas (Wong-Riley, 1989). Cuantificando la actividad metabólica es posible inferir si las entradas artificiales evitan la caída en la funcionalidad de las neuronas corticales deprivadas.

- *Volumen*: El mantenimiento estructural de la corteza depende de la actividad entrante (Tailby et al., 2005). Tras una desaferentización crónica, el tamaño de la región cortical afectada disminuye (Machin et al., 2004; Mowery et al., 2009). El análisis volumétrico de los centros desaferentizados es un indicador de la capacidad de la estimulación artificial para evitar la degeneración estructural que sufre la corteza tras la lesión periférica.
- *Circuitos inhibitorios*: La mayoría de los fenómenos de reorganización cortical que siguen a una amputación son mediados por procesos de desinhibición cortical (Jain et al., 1998). La desaferentización periférica provoca la pérdida inmediata de aferencias excitatorias a la corteza. Así, las interneuronas inhibitorias, que se mantenían activadas por estas entradas, dejan de inhibir a sus dianas. Esto provoca la expresión inmediata de aferencias subumbrales que lleva a la reorganización cortical (Garraghty et al., 1991). Por este motivo, es necesario cuantificar la inhibición cortical para entender cómo está afectando la estimulación artificial al remodelamiento plástico.
- *Inervación colinérgica*: El núcleo basal magnocelular (NBM) es la principal fuente de inervación colinérgica de la corteza (Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1983b). El sistema colinérgico basalocortical está implicado en la mayoría de fenómenos plásticos como aprendizaje, atención (revisado en Hasselmo and Sarter, 2011), y reorganización cortical tras privación sensorial (Conner et al., 2010), siendo clave en el procesamiento de los estímulos en relación al contexto (revisado en Furey, 2011; Goard and Dan, 2009). Este hecho, junto con los resultados de estudios previos que demuestran una disminución del neuropilo colinérgico cortical tras desaferentización (Avendano et al., 1995), nos llevaron a estudiarlo como una medida de la integración de las entradas periféricas aplicadas de forma artificial.
- *Actividad funcional*: Las manipulaciones de las entradas sensoriales modifican la actividad funcional o electrofisiológica de la corteza. Estos cambios fueron ya demostrados desde los primeros estudios de plasticidad en monos adultos tras lesiones de nervios periféricos (Merzenich et al., 1983a). Decidimos estudiar este parámetro para correlacionar las posibles alteraciones anatómicas inducidas por la amputación/estimulación con alteraciones en los registros corticales y



encontrar, además, si la estimulación neuroprotésica era capaz de normalizar la actividad funcional de la corteza desaferentizada.

Otras estructuras subcorticales de la vía trigeminal fueron analizados para establecer (si procedía) posibles relaciones a los fenómenos neuroplásticos detectados en corteza.

- En las **estructuras subcorticales**, VPM y Pr5, hicimos el estudio metabólico y estructural (análogo al cortical, *actividad metabólica y volumen* ocupado por los núcleos) con el objetivo de determinar si los cambios corticales inducidos por la estimulación artificial podrían ser resultado de alteraciones en la vía primaria tronco-talámica-cortical. Hasta nuestros días, no hay consenso absoluto sobre el componente subcortical de la plasticidad en adulto. La mayoría de autores explican los fenómenos de reorganización con teorías corticocéntricas, donde actúan mecanismos intracorticales, que incluyen el desenmascaramiento de conexiones preexistentes tálamo-corticales con un alto grado de divergencia, o por conexiones intracorticales a gran escala, y/o la ramificación de axones intracorticales o TC. Otros autores, apoyados en los cambios detectados en los núcleos de la columna dorsal, el núcleo principal del trigémino y el complejo ventrobasal talámico, sugieren la importancia de las estructuras subcorticales en los fenómenos plásticos y reorganizaciones dependientes de la entrada periférica (Jones, 2000; Negredo et al., 2009; Panetsos et al., 1995; Panetsos et al., 1997; Pettit and Schwark, 1993).

### 1.3. ELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES Y FUNCIONALES

Las distintas variables del estudio se analizaron mediante marcadores, cuyas alteraciones pudieran reflejar mecanismos de plasticidad dependiente de actividad.

- Actividad metabólica. Para estudiar los efectos de la neuroestimulación sobre la actividad metabólica cortical, evaluamos este parámetro mediante la detección histoquímica de la **enzima citocromo-c-oxidasa** (CyO). La CyO es una enzima mitocondrial, limitante en el proceso de obtención de energía por metabolismo oxidativo (Wong-Riley, 1989). La CyO está implicada a nivel transcripcional en el acoplamiento entre actividad funcional y metabolismo energético. Se ha demostrado que las subunidades del receptor glutamatérgico NMDA (NR1, NR2b) y las subunidades de CyO están correguladas por el mismo factor de transcripción, el factor respiratorio nuclear tipo 1 (NRF-1; Dhar and Wong-

Riley, 2009). NRF-1 es activado, tanto a nivel de proteína como de ARNm, por la actividad neuronal despolarizante (Yang et al., 2006). En consecuencia, los cambios en el nivel de actividad neuronal inducen cambios concomitantes en la expresión de CyO, regulándose a nivel transcripcional para ajustarse a la nueva demanda energética (Wong-Riley, 1989; Zhang and Wong-Riley, 2000). De esta forma, la actividad de la CyO es capaz de reflejar demandas funcionales acumulativas tanto en periodos subagudos como crónicos. Este hecho avala el empleo de la CyO en nuestro estudio, puesto que nos permite detectar cambios a largo plazo. Otras técnicas que emplean genes de expresión inmediata, recaptura de glucosa o respuesta hemodinámica, sólo reflejan las respuestas metabólicas a los estímulos durante el tiempo que dura la experimentación (Bruchey and Gonzalez-Lima, 2008; Hevner et al., 1995).

- Volumen. Las mediciones volumétricas se llevaron a cabo sobre **secciones reaccionadas para CyO**. La intensidad del producto de esta reacción histoquímica, o intensidad del marcado, es directamente proporcional a la concentración de mitocondrias del tejido (Hevner and Wong-Riley, 1989). Esto implica que regiones metabólicamente muy activas, como aquellas con alta densidad de contactos sinápticos, reaccionen fuertemente y puedan diferenciarse del neuropilo circundante. Este marcado en la vía trigeminal delimita con exactitud las unidades morfológicas discretas correspondientes a cada vibrisa (*barriletes*, *barriloides* y *barriles*) en los núcleos centrales (Archibald et al., 1991; Ma, 1991; Van Der Loos, 1976; Woolsey and Van der, 1970; Woolsey and Van der Loos, 1970). En el caso de la corteza, los *barriles* de capa IV son las zonas de máxima actividad sináptica, por los contactos tálamo-corticales (Wong-Riley and Welt, 1980). Así, el volumen ocupado por los *barriles* puede ser fácilmente cuantificado, con las técnicas estereológicas adecuadas, considerando las distintas intensidades de la reacción cortical a la CyO.
- Circuitos inhibitorios. Para estudiar los efectos de la neuroestimulación sobre los circuitos inhibitorios, evaluamos cuantitativamente dos subpoblaciones de interneuronas corticales inhibitorias (DeFelipe, 1993; DeFelipe, 1997); revisado en Celio, 1990). Para ello, utilizamos como marcador la inmunoexpresión de sendas proteínas ligantes de calcio (CaBPs, por su siglas en inglés *Calcium Binding Proteins*), **Parvalbúmina** (PV) y **Calbindina** (CB). Dada la naturaleza GABAérgica de todas las neuronas corticales no piramidales PV-positivas y de

una gran mayoría de las CB-positivas (Gonchar and Burkhalter, 1997), los cambios en la expresión de estas proteínas son indicadores válidos del estado funcional de las redes inhibitorias.

- **Inervación colinérgica.** Los niveles de acetilcolina (ACh) fueron estimados a través de la inmunoexpresión de la **enzima colina acetil-transferasa (ChAT)** en el neuropilo cortical. La ChAT es la enzima limitante para la síntesis de ACh y está presente exclusivamente en las neuronas colinérgicas. La ChAT es un biomarcador específico para este neurotransmisor, lo que determina que sus niveles de inmunoexpresión estén linealmente correlacionados con los niveles de ACh (Armstrong et al., 1983; Kuhar and Yamamura, 1976; Mesulam et al., 1983a; Mesulam et al., 1983b); revisado en Phillis, 2005).
- **Actividad funcional:** La actividad electrofisiológica de la corteza se estudió mediante registros de potenciales evocados (PE) tras la estimulación eléctrica del nervio/neuroma. Para comprender los posibles cambios en el procesamiento de la información tras amputación/estimulación, decidimos evaluar dos componentes clave de la primera onda negativa (N1) del PE, latencia y amplitud o área. Esta onda está relacionada con la activación de las neuronas piramidales supragranulares y muestra alteraciones ante cambios crónicos de las entradas sensoriales (Kublik, 2004).
- **Estructuras subcorticales:**  
Actividad metabólica y Volumen. De forma análoga al estudio cortical (y siguiendo el mismo fundamento), estas variables fueron evaluadas mediante la expresión histoquímica de la CyO.

## 1.4. LIMITACIONES TÉCNICAS

### 1.4.1. Estudio morfológico. Estimaciones cuantitativas

#### RECUENTOS INSESGADOS. ESTEREOLOGÍA

Las técnicas estereológicas usadas (estimador de Cavalieri y fraccionador óptico) son métodos insesgados y eficientes, que han sido extensamente aplicados para estimar volúmenes y poblaciones de estructuras neurales (revisado en Avendano et al., 2005). A pesar de su reconocido valor como herramientas cuantitativas, *a priori* podrían parecer

medidas gruesas de las estructuras morfológicas (especialmente para la estimación de volumen). Como se discute en el libro de Howard y Reed (Howard and Reed, 1998), en un experimento biológico, analizado microscópicamente, la variabilidad se distribuye de forma que el 70% se debe a la variabilidad interindividual (o biológica *per se*), 20% a la variabilidad entre bloques (o porciones del objeto original), 5% a la variabilidad entre secciones, 3% a los distintos campos de visión analizados, y sólo un 2% a la variabilidad entre mediciones. En consecuencia, aumentando los esfuerzos en tomar medidas con herramientas poderosas y finas en detalles, como algoritmos avanzados de procesamiento de imágenes, realmente sólo mejoraríamos la precisión general del experimento en un 2%. Esto determina que las técnicas estereológicas sean muy eficientes, porque el esfuerzo se hace en el diseño y muestreo sistemático, factores que el propio experimentador puede controlar y que tienen un mayor peso sobre la variabilidad.

El estimador de Cavalieri puede que sea uno de los estimadores estereológicos, basados en el diseño, de aplicación más directa. Numerosos trabajos en neurociencia han aplicado esta técnica para la estimación de volumen, incluyendo estudios de volumen cerebral global, corteza de *barriles*, hipocampo, diversos núcleos subcorticales, amígdala y otras estructuras como la sustancia blanca. Por su parte, el fraccionador óptico es una técnica muy potente porque no considera el volumen del espacio de referencia (y, por tanto, no se altera por cambios dimensionales en el mismo por el procesamiento histológico). El grosor de los cortes es una de las causas de mayor sesgo experimental, puesto que es susceptible de alterarse en casi todos los procesos de tinción (desde el seccionamiento a la propia incubación de los Ab). Muchas técnicas que consideran el tamaño, sin embargo, asumen grosores iguales a lo largo del corte. Esta asunción constituye un sesgo experimental grande, que anulamos al trabajar con el fraccionador óptico.

La clave para la naturaleza insesgada de las estimaciones estereológicas es preservar la aleatoriedad en los muestreos sistemáticos y aplicar unos correctos principios matemáticos. Los coeficientes de error debidos al procedimiento estereológico (CE, que indica la precisión de las estimaciones) obtenidos en nuestras mediciones tienen unos valores de entre 0,01 y 0,04. Dado estos bajos CE, es posible sugerir con seguridad que la variabilidad representa una varianza biológica real, y que los métodos para estimar el volumen cortical y la población de IN han sido efectivos y apropiados.

## RECuentos *PROBABLEMENTE* SESGADOS. DENSIDAD ÓPTICA (DO)

Las mediciones de DO son mediciones presumiblemente sesgadas, en cuanto a que no consideran factores tridimensionales, como la distribución heterogénea de los elementos en el nivel profundidad o las alteraciones en el grosor del tejido dentro de una misma sección. Aún así, y siempre teniendo esto en cuenta, los argumentos científicos apoyan su uso, siempre que se empleen de forma extremadamente cuidadosa, con un muestreo sistemático adecuado y con unos criterios de normalización entre cortes y casos, para reducir al máximo el error.

### Actividad Metabólica. CyO.

La DO de secciones reaccionadas histoquímicamente para CyO ha sido ampliamente utilizada como medida para estimar el grado de actividad metabólica funcional y los cambios inducidos a largo plazo por alteraciones de la entrada periférica (Bruchey and Gonzalez-Lima, 2008; Farahvar et al., 2007; Gulyas et al., 2006; Hevner and Wong-Riley, 1989; LaManna et al., 1996; Valla et al., 2001; Wong-Riley, 1979) entre muchos otros). Otras aproximaciones experimentales, como ensayos bioquímicos sobre homogeneizados tisulares (Hevner and Wong-Riley, 1989), cuantificación inmunohistoquímica o de doble inmunocitoquímica por microscopía confocal de escaneo por láser (Gulyas et al., 2006) han mostrado que la distribución en la cantidad de la enzima CyO coincide con la distribución histoquímica de la actividad de la enzima CyO. Esto determina que, bajo muy cuidadosas condiciones experimentales, la DO pueda ser usada como un marcador indirecto de la actividad CyO.

En nuestra experimentación, el procesamiento del tejido y de las imágenes se realizó para minimizar el ruido debido a la metodología. Como describimos previamente, las muestras de cada grupo experimental (C, A y S) fueron siempre incubadas simultáneamente, en la misma sesión y medio de incubación y durante la misma cantidad de tiempo a la misma temperatura. Las fotografías fueron tomadas a la misma magnificación, con idénticas condiciones de exposición y luminosidad. Sin embargo, todas estas precauciones podrían no ser suficientes para hacer comparaciones intergrupo basadas en los valores de DO obtenidos directamente de cada hemisferio, por dos razones básicas: i) la densidad de tinción CyO puede variar incluso entre cerebros del mismo grupo (por ejemplo, por perfusiones desiguales), ii) el punto final para terminar la reacción sigue un criterio cualitativo. El primer punto fue optimizado experimentalmente seleccionando sólo aquéllos cerebros con una reacción homogénea

entre los dos hemisferios. Los análisis cualitativos revelaron que la intensidad relativa de CyO entre animales e incluso entre secciones del mismo animal podía variar, pero, a pesar de estas variaciones, las diferencias en la DO relativa dentro y entre grupos se mantuvieron siempre constantes (ver Tabla 5). El factor más importante es que la variable que tomamos para hacer los análisis comparativos intergrupo no es el valor directo de DO para cada hemisferio, sino el porcentaje de cambio (contralateral versus ipsilateral), anulando por tanto la posible variabilidad individual debida al método.

#### Inervación colinérgica. ChAT.

La cuantificación de la intensidad de inmunotinción por mediciones de DO es un método ampliamente utilizado para evaluar y comparar niveles de inmunoexpresión bajo distintas condiciones experimentales (Burke and Kenyon, 1991; Ma et al., 2001; Masliah et al., 1990; Sutoo et al., 1994).

Del mismo modo que para la histoquímica CyO, en la inmunotinción para ChAT el procedimiento fue estandarizado para minimizar cualquier sesgo o variabilidad debido a la experimentación. En cada animal, los dos hemisferios fueron siempre procesados simultáneamente, con los mismos reactivos y bajo las mismas condiciones, para que sus intensidades fueran comparables. Además, en cada sesión de inmunomarcado se procesaron a la vez cerebros de los tres grupos experimentales. La variable tomada para el recuento no fue el valor directo de DO relativa de cada hemisferio (ipsilateral o contralateral para cada grupo experimental), sino el porcentaje de cambio interhemisférico de cada animal para cada grupo experimental.

#### ***1.4.2. Estudio funcional. Registros electrofisiológicos***

En el estudio electrofisiológico el objetivo era comparar la actividad cortical que evocaba la aplicación de corriente sobre nervios seccionados y manipulados. En este paradigma, debido a la propia organización de un nervio lesionado a largo plazo, el número de fibras que responde a una estimulación de parámetros específicos no es comparable entre los animales C, A y S (Bourbeau et al., 2011). Para que los registros fueran comparables, ajustamos las inyecciones iniciales de corriente justo por encima del umbral, es decir la potencia mínima para que se produjera un PE (1x). Después proporcionamos al nervio/neuroma trenes de pulsos de 200  $\mu$ s de duración a una

frecuencia de 1 Hz y repetimos los trenes a intensidades de estimulación crecientes (2x - 5x). A pesar que los parámetros de la corriente 1x (y, en consecuencia 2x y 5x) no sean iguales para cada grupo, este estudio nos permite comparar y analizar las diferencias en el nivel de excitabilidad y capacidad de respuesta de las neuronas de la corteza desaferentizada y tras estimulación mantenida desde la periferia.

## 2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que la amputación de un nervio periférico sensorial provoca alteraciones anatómicas y funcionales en las estructuras centrales de la vía, y que la sustitución artificial de las entradas periféricas por una ES crónica es capaz de prevenir la mayoría de estos efectos inducidos por la desaferentización, manteniendo la estructura y funcionalidad de la corteza y estructuras subcorticales en niveles cercanos a la normalidad.

CORTEZA		C	A	S
Act. Metab. II/III		↑	↓	=
Act. Metab. IV		=	↓	=
Act. Metab. PMBSF		=	↓	=
Vol. II/III		↑	=	=
Vol. IV		=	↓	=
Vol. PMBSF		=	↓	=
N total PV+ II/III		↑	↓	=
N total PV+ IV		=	↓	=
N total PV+ PMBSF		=	↓	=
N total CB+ II/III		=	↓	=
N total CB+ IV		=	=	↑
N total CB+ PMBSF		=	↓	=
Inerv. ACh II/III		=	↓	↓
Inerv. ACh. IV		=	↓	↓
Inerv. ACh. PMBSF		=	↓	↓
Latencia		=	↑	=
Amplitud		=	↓	=

VPM/ Pr5		C	A	S
Vol. VPM		=	↓	=
Vol. Pr5		=	↓	=



**Fig. 19.** Representación esquemática de los principales resultados obtenidos en corteza de *barriles* (izquierda) y estructuras subcorticales (derecha). En el lateral se indica cada variable analizada (incluyendo especificidad de región capa II/III, capa IV, y PMBSF tomado en su conjunto, en el caso de corteza). En los recuadros se muestra el signo de la relación interhemisférica para cada variable y para cada grupo experimental (C: Control, A: Amputación, S: Estimulación). En cada variable: flecha negra hacia arriba indica que el hemisferio (o lado) afectado por la lesión tomó un valor medio significativamente mayor que el hemisferio (o lado) no afectado; flecha azul hacia arriba indica que el hemisferio (o lado) afectado por la lesión tenía una tendencia significativa a tomar un valor medio mayor que el hemisferio (o lado) no afectado; flecha negra hacia abajo indica que el hemisferio (o lado) afectado por la lesión tomó un valor medio significativamente menor que el hemisferio (o lado) no afectado; flecha azul hacia arriba indica que el hemisferio (o lado) afectado por la lesión tenía una tendencia significativa a tomar un valor medio menor que el hemisferio (o lado) no afectado; signo = indica que el valor medio del hemisferio afectado fue igual al valor medio del hemisferio no afectado. Las variables en las que la estimulación neuroprotésica del nervio periférico contrarrestó el efecto de la amputación están incluidas en recuadros amarillos.

Las manipulaciones periféricas de nuestra experimentación (amputación y estimulación neuroprotésica) afectaron de forma diferencial a cada variable anatomofuncional estudiada (Fig. 19). Sobre los *objetivos planteados en la sección II* de la Tesis, expondremos primero, y brevemente, los principales resultados encontrados para cada uno de los supuestos, para profundizar después, en las secciones subsiguientes, en las posibles causas y mecanismos neurobiológicos implicados en cada uno de ellos.

*OBJETIVO 1. Detectar y cuantificar los efectos de la amputación de un nervio periférico sensitivo sobre las características anatomofuncionales de la corteza somatosensorial primaria. De forma específica, evaluar si la amputación de nervio periférico modifica:*

- 1.1 *la actividad metabólica cortical*
- 1.2 *el volumen del neuropilo cortical*
- 1.3 *los circuitos inhibitorios corticales*

1.4 *la inervación colinérgica cortical*

1.5 *la actividad funcional cortical*

RESULTADOS CON RELACIÓN AL OBJETIVO 1. La amputación del nervio IoN:

- 1.1 disminuyó la actividad metabólica cortical, tanto en las capas II/III y IV analizadas de forma independiente, como en el conjunto de la corteza de *barriles*
- 1.2 modificó el volumen del neuropilo cortical. De forma específica, disminuyó significativamente el volumen del neuropilo de capa IV y del PMBSF considerado en su conjunto. El volumen de capa II/III no se vio afectado por la amputación
- 1.3 modificó los circuitos inhibitorios corticales, a través de alteraciones en el número total de dos subpoblaciones de interneuronas inhibitorias, PV- y CB-positivas, respectivamente. De forma específica, la amputación provocó un descenso en el número de interneuronas PV-positivas en todas las capas corticales estudiadas (II-IV de forma independiente y consideradas en su conjunto). El número de interneuronas CB-positivas de la corteza de *barriles* disminuyó de forma significativa en las capas II-III
- 1.4 disminuyó la inervación colinérgica cortical, tanto en las capas II/III y IV analizadas de forma independiente, como en el conjunto de la corteza de *barriles*
- 1.5 modificó la actividad funcional cortical. En concreto, provocó un aumento de la latencia y una disminución del área bajo la curva, ambos de la onda N de los PEs.

*OBJETIVO 2. Detectar y cuantificar los efectos de la estimulación neuroprotésica del nervio periférico sensitivo amputado sobre las características anatomofuncionales de la corteza somatosensorial primaria desaferentizada. De forma específica, evaluar si la estimulación neuroprotésica del nervio periférico amputado evita/modifica las consecuencias de la desaferentización sobre:*

- 2.1 *la actividad metabólica cortical*
- 2.2 *el volumen del neuropilo cortical*
- 2.3 *los circuitos inhibitorios corticales*
- 2.4 *la inervación colinérgica cortical*
- 2.5 *la actividad funcional cortical*

RESULTADOS CON RELACIÓN AL OBJETIVO 2. La estimulación neuroprotésica del nervio IoN amputado:

- 2.1 evitó la disminución en la actividad metabólica cortical detectada tras amputación. De forma específica, la actividad metabólica de toda la estructura cortical se mantuvo en niveles muy similares a los de los animales intactos tras la estimulación del IoN
- 2.2 evitó la caída de volumen en el neuropilo de capa IV y del PMBSF considerado en su conjunto. Tras estimulación neuroprotésica, el volumen de la corteza desaferentizada no disminuyó
- 2.3 modificó los eventos detectados tras la amputación en los circuitos inhibitorios corticales. De forma específica, la estimulación evitó el descenso en el número de interneuronas PV-positivas en todas las capas corticales estudiadas. La estimulación también mantuvo en niveles normales la población de interneuronas CB-positivas de capas II/III, evitando la caída detectada tras amputación. La estimulación del nervio IoN amputado, además, provocó un aumento de la población CB-positiva en la capa IV cortical
- 2.4 no evitó el descenso en la inervación colinérgica cortical detectado tras amputación. El neuropilo colinérgico de la corteza de *barriles* de los animales estimulados se mantuvo en niveles similares a los detectados en los animales amputados
- 2.5 evitó los efectos provocados por la amputación sobre la actividad funcional de la corteza desaferentizada. De forma específica, la estimulación disminuyó significativamente el aumento en la latencia y la caída en la amplitud de la

onda N provocadas por la amputación, determinando unos PEs muy similares a los encontrados en animales intactos.

*OBJETIVO 3. Evaluar cuantitativamente la posible contribución de las estructuras subcorticales en los procesos corticales arriba mencionados. De forma específica, evaluar si las manipulaciones periféricas tienen algún efecto sobre:*

*3.1 el volumen del neuropilo del núcleo ventral postero-medial, en tálamo*

*3.2 el volumen del neuropilo del núcleo principal del trigémino, en tronco*

RESULTADOS CON RELACIÓN AL OBJETIVO 3. Las manipulaciones periféricas (amputación y/o estimulación):

3.1 modificaron el volumen del neuropilo del VPM. En concreto, la amputación provocó un descenso en el volumen de este núcleo talámico. La estimulación evitó esta caída y mantuvo el volumen de VPM en niveles similares a los de los animales intactos.

3.2 modificaron el volumen del neuropilo del núcleo principal del trigémino, en tronco. Los efectos fueron muy similares a los detectados en el VPM: la amputación provocó una disminución en el volumen de Pr5, mientras que la estimulación del IoN amputado preservó la dimensión de este núcleo de la vía trigeminal.

## 2.1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN NEUROPROTÉSICA SOBRE LA CORTEZA DE *BARRILES* DESAFERENTIZADA

### ***2.1.1. Actividad metabólica y organización estructural***

Los resultados obtenidos para las estimaciones de CyO muestran que la amputación del nervio IoN tiene efectos notables sobre la actividad metabólica y volumen de neuropilo de las capas granular y supragranulares de la corteza de *barriles*, disminuyendo significativamente la intensidad (aproximadamente un 10%) y el volumen metabólicamente activo (-3% en las capas II / III y -15% en la capa IV). La ES

del nervio seccionado evitó la caída tanto en la actividad metabólica, como en el volumen cortical, manteniendo los valores similares a los de la situación control. Este efecto neuroprotector de la estimulación fue especialmente notable en la capa IV, donde los *barriles* conservaron por completo sus características estructurales (Fig. 11A).

Los hallazgos en animales amputados están de acuerdo con estudios previos de desaferentización periférica que muestran un descenso en la actividad metabólica y hasta un 16% de pérdida de las dimensiones de la corteza de los *barriles* (Kossut, 1992b; Machin et al., 2004; Mowery et al., 2009; Panetsos et al., 2008). En otros sistemas como el visual o el auditivo también se han demostrado cambios degenerativos en el marcado con CyO en los núcleos centrales tras la deprivación sensorial (Wong-Riley, 1979; Wong-Riley and Welt, 1980). La mayoría de estudios que profundizan en los posibles mecanismos implicados en este descenso vienen del sistema auditivo. Distintos estudios han demostrado que la ausencia de actividad aferente y la pérdida de aporte trófico desde la cóclea (Hardie and Shepherd, 1999) provoca la degeneración y muerte de las células en el ganglio espiral. La degeneración transneuronal no alcanza al núcleo coclear en el tronco, pero sí provoca una significativa pérdida de volumen (Matsushima et al., 1991; Powell and Erulkar, 1962), así como una clara reducción en la actividad funcional (metabólica) de sus neuronas.

A la vista de nuestros resultados, sugerimos que la pérdida de organización metabólica y estructural detectada en la corteza tras la lesión del IoN se debe a la falta de estimulación aferente, que lleva al silenciamiento y ausencia de entradas despolarizantes en las zonas corticales afectadas. De hecho, los cambios más drásticos se observan en capa IV, sugiriendo déficits en la transmisión tálamocortical (TC). La falta de activación glutamatérgica podría derivar en una regulación a la baja de la actividad biosintética (y, por tanto metabólica) de las neuronas corticales, como ya ha sido demostrado para distintos núcleos mesencefálicos auditivos deprivados (cuerpo trapezoide, núcleo de la oliva superior, núcleo del lemnisco lateral y núcleo central del colículo inferior) (Shepherd et al., 1997). La pérdida de neuropilo podría deberse al encogimiento tanto de las terminaciones TC como a reducciones en las dimensiones de las neuronas corticales (Durham et al., 1993; Wong-Riley et al., 1978). El hecho de que las capas supragranulares se vean menos afectadas por la deprivación se debe probablemente a la propia organización columnar de la corteza de *barriles*, que determina un flujo secuencial en la activación de las distintas capas corticales. De este

modo, la capa IV sufre un encogimiento casi inmediato puesto que es la principal receptora de las llegadas talámicas. Las neuronas de capa II/III, al ser activadas posteriormente, probablemente compensen los efectos derivados de la caída en la activación, por parte de las células de capa IV, con las densas proyecciones intracorticales que reciben.

Los estímulos aplicados de forma artificial en nuestro estudio son capaces de re-activar al nervio amputado y llegar a corteza, provocando los contactos sinápticos necesarios para mantener la actividad metabólica y organización estructural de las neuronas corticales. Hasta nuestros días, no hay estudios previos que muestren este efecto de la neuroES artificial sobre la estructura cortical. Sólo un trabajo previo, aunque con estudios a nivel del tronco, ha mostrado resultados similares por la activación eléctrica artificial del nervio auditivo (Wong-Riley et al., 1981). En este trabajo, los autores implantaron en dos gatos adultos, previamente deprivados durante 6 meses, un electrodo coclear para la estimulación continua durante 1 mes. Los animales estimulados mostraron recuperación en los niveles de actividad CyO en el núcleo coclear ventral ipsilateral, núcleo medial del cuerpo trapezoide contralateral, núcleo superior lateral de la oliva ipsilateral, núcleo del menisco lateral contralateral y colículo inferior contralateral. Estos resultados son especialmente interesantes puesto que la estimulación se hace tras un largo período de deprivación (5-6 meses), demostrando que los núcleos centrales permanecen silenciados pero con capacidad de ser re-activados.

Nuestros resultados demuestran que las neuronas corticales, como las ecuaciones de Maxwell predijeron (a pesar de haber sido ignoradas en el campo de la neurociencia), aparte de generar campos electromagnéticos también son sensibles a los que le llegan desde el exterior de forma artificial (revisado, entre otros, en Bedard and Destexhe, 2009; Gonzalez Andino et al., 2011). Las evidencias experimentales de los últimos años demuestran que los campos eléctricos débiles generados de forma natural por la actividad fisiológica de las redes neocorticales son lo suficientemente fuertes como para (i) modificar significativamente la excitabilidad de sus propias células y (ii) modificar la sincronización de las propias redes (Frohlich and McCormick, 2010). Por otra parte, los campos eléctricos y los procesos bioquímicos neuronales están profundamente entremezclados y, por lo tanto, los campos eléctricos pueden afectar también a la conductancia dendrítica, liberación de neurotransmisores y difusión de los iones y otras moléculas cargadas. La alteración de la excitabilidad y la sincronización de la red son

claves para las dos reglas sinápticas de plasticidad dependiente de experiencia: los mecanismos hebbianos y la plasticidad homeostática. De hecho, se ha demostrado que los procesos de auto-reparación del tejido neural van acompañados de la modulación espontánea de los campos extracelulares (Floel and Cohen, 2010) y la aparición de actividad sincrónica (Carmichael and Chesselet, 2002).

Todas estas evidencias, junto con nuestros resultados que muestran que las neuronas corticales desaferentizadas son capaces de mantener su actividad por campos eléctricos generados de forma artificial desde la periferia, hacen considerar la neroestimulación periférica como una de las herramientas futuras más prometedoras para modular la plasticidad neural.

### **2.1.2. Circuitos inhibitorios. Interneuronas corticales**

La amputación de nervio periférico llevó a consecuencias drásticas sobre las interneuronas inhibitorias corticales, provocando descensos medios del -20% para las PV-positivas y -12% para las CB-positivas (significativa en las capas supragranulares). La estimulación neuroprotésica del IoN seccionado evitó estos cambios degenerativos, manteniendo la población de IN PV-positivas en todas las capas corticales estudiadas y la de IN CB-positivas en la capa que se había visto afectada por la amputación.

Nuestros resultados están de acuerdo con todos los estudios previos que determinan que los circuitos inhibitorios corticales sean considerados uno de los principales mecanismos responsables para la plasticidad dependiente de actividad (revisado en Jain et al., 1998). Estudios anteriores han mostrado una regulación *a la baja* de la expresión de GABA o GAD, rápida y de duración variable, en interneuronas corticales tras la desaferentización (Gierdalski et al., 1999; Rosier et al., 1995; Welker et al., 1989). También se han demostrado disminuciones a largo plazo en las interneuronas corticales que expresan PV y/o CB tras deprivación visual (Carder et al., 1996), auditiva (Desgent et al., 2010) y somatosensorial (Nowicka et al 2009).

La PV se encuentra principalmente en dos subpoblaciones de IN inhibitorias (DeFelipe, 1993; Williams and Lacaille, 1992), las grandes células en cesto de capas III, IV y V y las células en candelabro situadas densamente en las capas II/III. Las grandes células en cesto de la corteza de *barriles* reciben estímulo directo de las aferencias tálamocorticales, participan en la inhibición lateral y, muy probablemente, en la

inhibición pericolumnar, por su proyección horizontal a neuronas piramidales adyacentes a la zona de acción del estímulo periférico (Porter et al., 2001; Sun et al., 2006). Las células en candelabro son conocidas por “editar” la salida de las neuronas de proyección, las Pyr, haciendo sinapsis sobre el segmento inicial del axón de estas neuronas. (DeFelipe et al., 1989a).

La CB aparece en distintas subpoblaciones corticales, y en distinto grado de expresión. Está presente, aunque de forma débil, en las Pyr de capas II/III y V/VI (DeFelipe and Farinas, 1992) y en las IN excitatorias no Pyr de III/IV (células estrelladas). También se ha detectado en poblaciones dispersas de IN inhibitorias como las neurogliaformes (Jones et al., 1975); capas II-VI) o en las interneuronas de capa I. La subpoblación de IN inhibitorias CB-positivas por excelencia son las células bipenachadas (DeFelipe et al., 1989b), distribuidas principalmente por las capas II/III y V/VI. Estas IN están virtualmente innervadas por todas las Pyr y sinaptan sobre otras IN inhibitorias y sobre las dendritas de las Pyr.

La desafrentización periférica provoca la pérdida inmediata de aferencias excitatorias a la corteza. Así, las interneuronas inhibitorias, que se mantenían activadas por estas entradas, dejan de inhibir a sus dianas. Esto provoca la expresión inmediata de aferencias subumbrales (suprimidas por estas células inhibitorias) lo que lleva a la reorganización cortical (Garrahy et al., 1991). Aunque el papel de las interneuronas inhibitorias en la plasticidad dependiente de actividad no está completamente claro (Jiao et al., 2006; Nowicka et al., 2009; Sun et al., 2006), se ha demostrado que la privación sensorial inhibe fuertemente a las neuronas de disparo rápido, la mayoría de las cuales son IN que expresan PV (Kawaguchi and Kubota, 1997), debilitando el flujo de información inhibitorio proactivo (*feed-forward*), por los contactos sobre las neuronas de capas II/III. Esta desinhibición local se ha interpretado como un proceso compensatorio para mantener un equilibrio excitatorio-inhibitorio apropiado en la corteza deprivada.

La ES re-activa la vía silenciada, evitando la caída de excitación local y manteniendo el equilibrio excitación-inhibición, posiblemente por mecanismos de plasticidad homeostática. Además, al mantener estables los circuitos en los que participan las IN PV- y CB-positivas, la ES periférica artificial es capaz de mantener la verticalidad del procesamiento de la información, canalizando la actividad neuronal en las columnas



corticales (DeFelipe et al., 1990) y evitando la reorganización cortical mediada por el desenmascaramiento de los aferencias latentes.

### 2.1.3. *Inervación colinérgica*

Al estudiar la densidad de neuropilo colinérgico, observamos que, tanto en amputación como en estimulación, existe una significativa caída, de aproximadamente el 20%, en el inmunomarcado para ChAT. Es decir, la actividad colinérgica cortical no se vio afectada por la estimulación periférica artificial.

Este resultado es realmente interesante si consideramos los mecanismos y procesos en los que está implicado el sistema colinérgico. De los distintos sistemas neuromoduladores (noradrenalina, dopamina o acetilcolina, entre otros) es el sistema colinérgico el que mayor *atención* está despertando en los últimos años. Probablemente esto se deba al cambio en la concepción del sistema colinérgico como algo “difuso” (Lehmann et al., 1980), incluso como una “prolongación” del sistema reticular para la facilitación y atención de los procesos corticales (revisado extensamente en Rasmusson, 2000), para pasar a ser concebido como un sistema preciso, activo y determinante en los fenómenos de plasticidad y procesamiento de la información (ver recientes revisiones Munoz and Rudy, 2014; Sarter et al., 2014). El núcleo basal magnocelular (NBM) del prosencéfalo es la principal fuente de aferencias colinérgicas a la corteza (Mesulam et al., 1983b). Recientemente se ha demostrado cómo las neuronas colinérgicas están organizadas topográficamente en este núcleo, en función de las conexiones entre sus áreas corticales diana (Zaborszky et al., 2013). Este hecho es fundamental puesto que avala la existencia de un sistema colinérgico preciso y organizado, formando parte de circuitos cortico-subcorticales implicados en el procesamiento cognitivo de la información (Bloem et al., 2014; Golmayo et al., 2003).

La ACh puede alterar la excitabilidad neuronal y la eficacia sináptica (Gil et al., 1997), aunque los mecanismos exactos para estos cambios no son totalmente conocidos. Distintas evidencias experimentales han mostrado que eliminando la actividad colinérgica cortical, no se produce reorganización de los mapas neurales (Conner et al., 2003; Conner et al., 2010; Ramanathan et al., 2009), o que emparejando temporalmente la estimulación artificial del NBM con un estímulo auditivo periférico, es posible la reorganización masiva de la corteza auditiva primaria (Kilgard and Merzenich, 1998),

modificando las sinapsis intracorticales a largo plazo, en ausencia de cambios en la transmisión tálamo-cortical (Froemke et al., 2013). El neuropilo colinérgico tiene una clara distribución laminar, con presencia en todas las capas corticales, además de modular la sinapsis tálamocortical (Metherate and Ashe, 1993). Las terminaciones colinérgicas sinaptan además con IN corticales excitatorias e inhibitorias y potencian los circuitos de salida dependientes de las conexiones intracorticales (Metherate and Weinberger, 1989; Sillito and Kemp, 1983). Xiang y colaboradores (Xiang et al., 1998) ha sugerido un papel inhibitorio para la ACh en las conexiones intracolumnares y un papel facilitador en las conexiones intralaminares horizontales.

La pérdida de inervación colinérgica, detectada en nuestro estudio, en las cortezas desaferentizadas está de acuerdo con observaciones de trabajos clásicos donde se detectaron regulaciones *a la baja* de ACh tanto a corto como a largo plazo tras la desaferentización periférica (Avendano et al., 1995; Rothe et al., 1990). Además, esta disminución afecta a todas las capas corticales analizadas, granular y II/III, sugiriendo su participación en mecanismos de plasticidad compleja, donde intervienen circuitos intrínsecos y extrínsecos. La falta de recuperación en los animales estimulados podría estar indicando que la estimulación artificial no modula tales procesos. Este resultado abre todo un campo de experimentación. Sus posibles implicaciones para conseguir neuroprótesis funcionales, capaces de integrarse completamente en los mapas corporales, hace que dediquemos todo un apartado en la sección de Direcciones Futuras (3.3. *Implicaciones del sistema colinérgico*).

#### **2.1.4. Mantenimiento de la actividad funcional**

Los resultados obtenidos en los análisis electrofisiológicos muestran que, tanto la amputación como la estimulación neuroprotésica conllevan a cambios detectables en la actividad funcional de la corteza. Los PEs registrados en la corteza de *barriles* de los animales amputados difieren de manera significativa de los registrados en animales C (latencias de entre 35 - 40% más largas y áreas 70% menores). Sin embargo, los PEs registrados en la corteza de los animales estimulados son muy similares a los registrados en animales C (latencias más largas de 10 - 25% y áreas 30 - 40% menores).

El aumento de la latencia y la disminución de amplitud de la onda N en animales desaferentizados podría tener su origen en una disminución de la actividad en las capas

corticales supragranulares. En los animales control la onda N está formada por dos componentes que aparecen con un retraso de 1,5-4,0 ms (Jackson and Cauller, 1998; Kublik et al., 2001). La primera de ellas desaparece con breves enfriamientos de la superficie cortical, lo que sugiere que su origen está en la actividad de las células Pyr supragranulares (Kublik et al., 2001). Como demuestran los resultados morfológicos, la ausencia crónica de entradas periféricas en los animales A parece provocar una caída general en la actividad cortical, que comienza en las neuronas de capa IV y sigue en las células de capas II/III. Probablemente esto provoca un descenso en la excitabilidad de las células supragranulares, reduciendo su capacidad para una respuesta rápida a los estímulos entrantes (como la corriente aplicada para los estudios electrofisiológicos). Nuestros resultados para los animales S muestran que la estimulación neuroprotésica es capaz de mantener unos niveles de excitación y sincronización muy similares a las de los animales intactos, normalizando la capacidad de respuesta de las células corticales. El aumento de las latencias en los animales A podría ser debido a una menor actividad GABAérgica, apoyando los resultados detectados en las poblaciones de IN PV- y CB-positivas.

Nuestros datos son totalmente compatibles con estudios electrofisiológicos en gatos congénitamente sordos que muestran un aumento de la actividad cortical después de una estimulación eléctrica a largo plazo (Klinke et al., 1999). Son también compatibles con la recuperación de actividad neural observado en el colículo superior después de una estimulación eléctrica del nervio auditivo interrumpido (Chouard et al. 1983; Marasco and Kuiken 2010; Matsushima et al. 1991; Schwartz et al. 1993).

El mantenimiento de normalidad en la actividad de la corteza somatosensorial observado en animales estimulados podría obedecer a las mismas leyes que la expansión de los *barriles* no afectados en los paradigmas experimentales en los que se eliminan algunas vibrisas, pero no todas. En estos modelos, los *barriles* que corresponden a los bigotes no afectados expanden su actividad hacia los *barriles* cercanos, pudiendo cubrir todo el PMBSF, probablemente debido a potenciación o *sprouting* de conexiones horizontales en las capas II/III y/o IV (Maier et al. 2003). La actividad de las fibras que quedan totalmente funcionales en el IoN amputado por la aplicación inmediata de estimulación, podrían estar actuando como los bigotes no afectados. Esto implicaría que la ES neuroprotésica es capaz de provocar un remodelamiento plástico en el que a la expansión de los campos receptivos de las fibras

activadas próximas a las dañadas (mediada fundamentalmente por mecanismos GABAérgicos), podría seguir una fase de consolidación y formación de nuevas conexiones.

Esta fase se caracteriza por un aumento en la transmisión horizontal entre las columnas correspondientes a las vibrisas o entradas que se mantienen y las columnas correspondientes a las aferencias deprivadas. En estos procesos está implicada la proteína quinasa Calcio-Calmodulina tipo II (CAMKII), lo que lleva a suponer que podrían estar relacionados con mecanismos de LTP. De hecho, la potenciación de las respuestas de la vibrisa mantenida que ocurre en ratones adultos de fenotipo salvaje (no manipulados genéticamente) no tiene lugar en aquéllos manipulados genéticamente para carecer del gen funcional para la CAMKII. En mamíferos adultos, eliminando todas las vibrisas excepto D1, también se ha encontrado una regulación *al alza* (de hasta 8 veces) del factor de transcripción CREB en la capa IV del *barril* correspondiente a la vibrisa mantenida.

A la vista de nuestros resultados, sería interesante, en estudios futuros, profundizar en parámetros y marcadores de plasticidad a largo plazo, donde la transmisión glutamatérgica y los receptores NMDA parecen tener un papel fundamental.

## 2.2. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN SOBRE ESTRUCTURAS SUBCORTICALES DESAFERENTIZADAS

Los resultados para las estimaciones de volumen de los núcleos de la vía lemniscal Pr5 y VPM muestran que, tanto la amputación como la estimulación provocan cambios en su estructura, muy similares a los detectados en corteza.

Si consideramos los porcentajes de caída tras amputación, en VPM es aproximadamente del -9%, en Pr5 esta caída es mayor, con un -16% y en corteza varían desde -3% para capas II/III al -15% para la capa IV (que determina una pérdida global en el PMBSF de -10%). Estos resultados parecen sugerir que los cambios en las estructuras subcorticales y la capa granular de la corteza están relacionados. Esto podría indicar que la plasticidad inducida por actividad en el individuo adulto tiene un componente tálamocortical claro (Jones, 2000), estando ya presente en estaciones tempranas del procesamiento de la información (Negredo et al., 2009; Panetsos et al., 1995; Pettit and Schwark, 1993).

La plasticidad inducida por actividad en las estructuras inferiores del sistema vibrisas-*barriles* ha sido mucho menos estudiada que a nivel cortical. Distintos estudios, con lesiones directas sobre el IoN, han mostrado, sin embargo, fenómenos plásticos morfológicos y funcionales a lo largo de toda la vía aferente tanto en períodos críticos del desarrollo como en individuos adultos (Kossut et al., 1988; Waite, 1984). A las evidencias de cambios en corteza de *barriles* (Machin et al., 2004; Machin et al., 2006; Mowery et al., 2009; Siucinska and Kossut, 1994), se suman remodelamientos anatomofuncionales inducidos por la desaferentización encontrados en el ganglio trigeminal, complejo nuclear del trigémino en el tronco o núcleos talámicos (Aldskogius and Arvidsson, 1978; Aldskogius et al., 1985; Kis et al., 1999). Trabajos previos de los Directores de esta Tesis, Panetsos y Avendaño, han aportado numerosas evidencias sobre los cambios morfométricos y electrofisiológicos en estructuras subcorticales resultantes de la plasticidad dependiente de actividad (Martin et al., 2014; Negredo et al., 2009; Panetsos et al., 1995; Panetsos et al., 1997). En el trabajo de 2009 de Negredo, los autores identificaron las neuronas *barrilete* de Pr5 mediante inyecciones retrógradas desde tálamo, y cuantificaron la plasticidad estructural en sus árboles dendríticos bajo distintas modalidades de interrupción de la entrada periférica. Uno de los resultados más sorprendentes fue la demostración de asimetrías laterales en la estructura dendrítica (principalmente en el número de árboles de menor grado y longitud dendrítica total) de las neuronas trigeminotalámicas de Pr5 en animales intactos. La privación sensorial irreversible, por sección del IoN, o la limitación del tacto activo, por el recorte de vibrisas, neutralizó e incluso revirtió las diferencias observadas, lo que constituye una demostración clara de la plasticidad dependiente de actividad en las estructuras subcorticales de la vía trigeminal.

Las disminuciones en el volumen de Pr5 y VPM tras amputación podrían deberse a degeneraciones transneurales, como se ha demostrado en monos denervados crónicamente (Rausell et al., 1992) con reducciones de volumen de hasta el 40% en el tálamo contralateral (Woods et al., 2000). Ésta parece ser una causa poco probable debido a que nuestra experimentación es a corto plazo (28 días). El estudio de Negredo de 2009 mostró una disminución de volumen en Pr5 tras sección completa del IoN, que también ocurría tras recorte de bigotes (Negredo et al., 2009). El recorte de vibrisas no supone daño al nervio y, por tanto, no es asumible que las alteraciones detectadas se deban sólo a una pérdida neuronal local. Otros mecanismos que podrían estar

implicados en la pérdida de volumen incluyen el encogimiento de las prolongaciones centrales desde las neuronas del TG, disminuciones del área de las células, como consecuencia de la pérdida de activación glutamatérgica, reorganizaciones en la distribución espacial de los árboles dendríticos o a una combinación de distintos factores.

Los resultados encontrados en los animales estimulados muestran que la ES previene la caída de volumen (aunque este efecto no alcanzó significación estadística), determinando que los porcentajes de cambio interhemisférico sean de aproximadamente -3% en VPM, y -7% en Pr5 (para corteza son de apenas un 1% en todas las capas estudiadas). Este efecto neuroprotector se debe probablemente a la capacidad de los estímulos artificiales de activar a las neuronas de estos núcleos, provocando el mantenimiento de su actividad metabólica funcional. Resultados similares han sido aportados por el grupo de Wong-Riley y Merzenich (Wong-Riley et al., 1981), en los núcleos auditivos del tronco para gatos con lesiones cocleares sometidos a estimulación timpánica.

Nuestros resultados sugieren que la organización estructural de los núcleos centrales depende del mantenimiento de la actividad aferente, y que cambios mantenidos en las entradas periféricas modifican también las estructuras subcorticales, aunque el impacto anatómico es mayor en la estructura cortical.



### **3. DIRECCIONES FUTURAS**

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, que muestran un claro efecto neuroprotector de la ES neuroprotésica, avalan la realización de estudios adicionales para profundizar en distintos aspectos de la plasticidad inducida por las BMIs.

#### **3.1. ESTUDIOS A LARGO PLAZO Y CON RETRASO EN EL INICIO DE LA ES**

En el trabajo que aquí presentamos hemos enfocado los estudios anatomofuncionales para determinar si la ES era capaz de evitar o prevenir las consecuencias negativas de la desaferentización. Ahora sabemos que la estimulación neuroprotésica aplicada durante 28 días es capaz de activar las neuronas corticales, manteniendo sus niveles normales de actividad funcional, metabólica y de neurotransmisión.

Sería interesante realizar los mismos experimentos pero con tiempos mayores de ES, por ejemplo 3 meses. De este modo, se podría profundizar en parámetros y marcadores de plasticidad a largo plazo. En tales estudios, sería conveniente elegir parámetros que analicen eventos de consolidación de la plasticidad en las capas supragranulares II/III, como ramificaciones de los árboles dendríticos y formación de nuevas sinapsis. Esto podría indicar que las fibras del IoN amputado que permanecen completamente funcionales por la aplicación inmediata de ES, integran los estímulos artificiales de forma casi fisiológica al desencadenar procesos típicos de los modelos de plasticidad en los que se eliminan algunas, pero no todas las vibrisas. De ser así, esto supondría un argumento sólido para demostrar el potencial de la ES periférica como herramienta para inducir plasticidad cerebral, con aplicaciones directas en el campo de la neurorrehabilitación/neurorreparación.

Otro aspecto interesante a considerar en futuros estudios, aparte de ES con distintos parámetros, es el inicio de la ES desde el momento de la sección del nervio. En este trabajo, la ES se aplica inmediatamente tras la amputación, de forma que se elimina la variable del silenciamiento de fibras por la privación crónica. Comprobando los efectos en tal supuesto, se encontraría si la ES es capaz de re-activar una vía que llega al “silenciamiento”. Esto es especialmente interesante en la clínica de amputados, donde generalmente entre la lesión y la posibilidad de tratamiento hay una ventana de tiempo grande, donde ocurren efectos degenerativos, hasta nuestros días, difíciles de recuperar.



### 3.2. ESTUDIOS DE LAS ESTRUCTURAS PERIFÉRICAS. TG Y NEUROMA

El estudio que aquí presentamos se ha focalizado en los efectos de la estimulación neuroprotésica sobre la estructura cortical. Las estructuras subcorticales se han analizado para determinar su posible contribución a los eventos detectados en corteza. Los resultados obtenidos motivan el análisis de otras estructuras de la vía aferente, como el ganglio trigeminal (TG) o el propio neuroma<sup>1</sup>.

Por un lado, el estudio de estas estructuras periféricas podría arrojar datos interesantes sobre los mecanismos de plasticidad que están operando en centros inferiores para alcanzar los cambios corticales. Por ejemplo, la organización estructural del neuroma terminal podría evaluarse como una medida de la capacidad de la estimulación artificial para generar campos eléctricos funcionales que eviten el crecimiento aberrante de las fibras lesionadas y las subsiguientes consecuencias a nivel central.

Por otro, podría abrir una línea de investigación enfocada en los efectos de la ES sobre la transmisión nociceptiva. Por ejemplo, sería interesante analizar los efectos de la ES sobre las subpoblaciones ganglionares específicas para cada modalidad sensorial (mecanocepción, nocicepción, propiocepción) y la composición de fibras mielínicas/amielínicas en el neuroma terminal. Esto podría determinar si los estímulos artificiales están siendo incorporados dentro de una modalidad mecanoceptiva, lo que, considerando la *teoría de compuerta para el dolor* de Wall y Melzack, podría reducir la transmisión nociceptiva (generalmente hiperexcitada tras amputación; revisado en Rasskazoff and Slavin, 2012). Además de los posibles efectos sobre el neuroma terminal, el estudio de la ES neuroprotésica periférica enfocada a la transmisión del dolor también podría incluir análisis de las reorganizaciones corticales que llevan a

---

<sup>1</sup> El neuroma es una estructura aberrante que se desarrolla en el cabo proximal de un nervio periférico lesionado cuando las fibras en regeneración no encuentran un ambiente adecuado donde crecer. La formación del neuroma terminal lleva, entre otras cosas, a fenómenos de excitabilidad patológica de las fibras que son atrapadas en una matriz densa de colágeno y cicatriz glial. Estas alteraciones en la actividad residual pueden llevar a cambios estructurales en otras estaciones de la vía afectada.

fenómenos plásticos maladaptativos tras amputación, como el dolor por miembro fantasma (PLP).

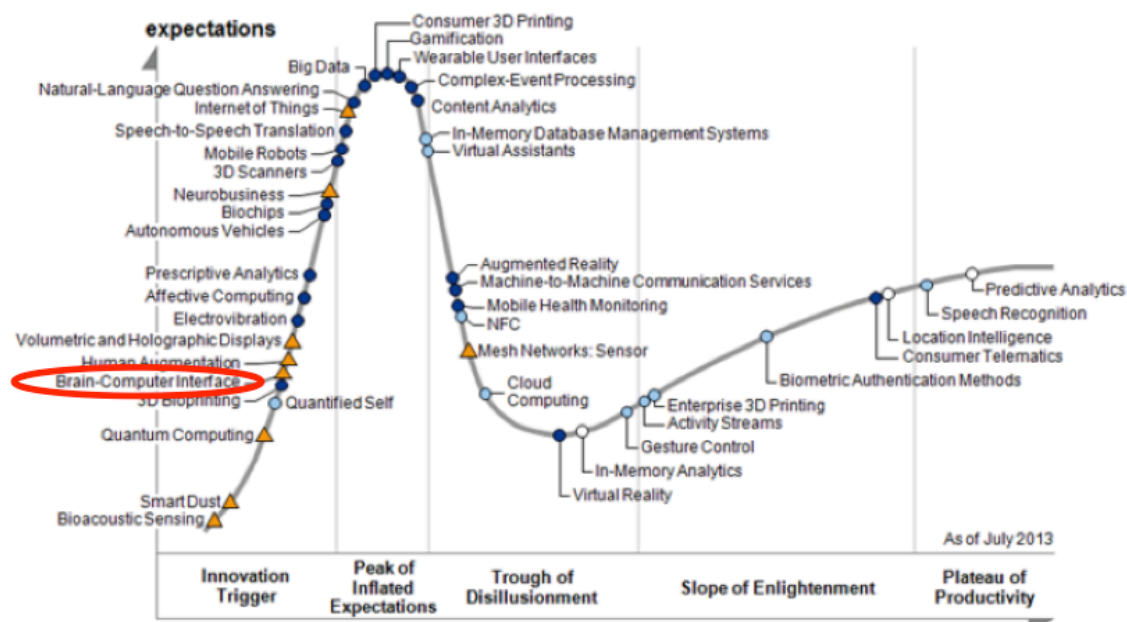
### 3.3. IMPLICACIONES DEL SISTEMA COLINÉRGICO

Los resultados de nuestro trabajo muestran que distintas características morfológicas y funcionales de la corteza de *barriles* desaferentizada se mantienen tras la aplicación de ES artificial. Este efecto neuroprotector no se refleja, sin embargo, en una normalización de la innervación colinérgica. Este hecho podría estar indicando que la disminución específica detectada en el neuropilo colinérgico cortical tras desaferentización y desaferentización/estimulación se debe a un fallo más profundo en la circuitería interconectada. Como consecuencia, la persistencia de la disminución colinérgica en la corteza desaferentizada, a pesar de la estimulación crónica de la vía aferente *primaria* sensorial, podría deberse a un fallo en la activación de las neuronas colinérgicas que proyectan a corteza desde el NBM. Bajo condiciones normales, esta activación parece estar mediada por circuitos con sistemas de control de lazo abierto o de lazo cerrado. En los primeros, la entrada sensorial llega al NBM a través de núcleos y circuitos intermedios (como la amígdala o el hipotálamo; Irle and Markowitsch, 1986). En los circuitos cerrados, la información sensorial alcanza al NBM tras pasar por la corteza (a través del circuito corteza somatosensorial primaria-corteza prefrontal-NBM-corteza somatosensorial primaria, propuesto por Golmayo et al., 2003). Ambos sistemas probablemente compartan puntos comunes, como las proyecciones excitatorias recíprocas entre la corteza insular y el NBM (Lemann and Saper, 1985). Estos núcleos (entre otros) están involucrados en procesos emocionales, cognitivos y de percepción, aprendizaje y memoria y reciben conexiones recíprocas desde la corteza somatosensorial secundaria, amígdala y diferentes núcleos talámicos. Las neuronas del NBM pertenecen a múltiples sistemas para el procesamiento cognitivo y sensorial de la información, y son gobernadas por circuitos muy diversos de naturaleza excitatoria e inhibitoria (Semba, 2000).

En el circuito abierto, la ausencia de efectos protectores de la estimulación sobre las neuronas colinérgicas del NBM podría sugerir que los circuitos neurales relacionados con la atención y motivación y sólo activados por entradas sensoriales relacionadas al contexto o importantes desde el punto de vista comportamental, no se activaron tras la ES neuroprotésica y, a su vez, éstos fueron incapaces de activar a las neuronas

colinérgicas del NBM. De hecho, estímulos viscerales activan el prosencéfalo basal y la activación mesolímbica de las neuronas colinérgicas corticopetales potencia el control cognitivo de las tareas atencionales (St Peters et al., 2011). El circuito cerrado córtico-prefronto-básalo-cortical podría estar compartiendo elementos del circuito abierto o, también, ser modulado por este circuito a través de las aferencias que llegan a las neuronas del NBM (Zaborszky et al., 1991). En cualquier caso, estos circuitos podrían ser activados desde la periferia sólo por estímulos relevantes, con claro contenido semántico. Solo la reorganización espontánea a mucho más largo plazo podría conducir a una recuperación de esa inervación colinérgica del territorio cortical desaferentizado (Avendano et al., 1995).

De este análisis se deriva, en primer lugar, la necesidad de estudiar en profundidad, en animales con nuestro mismo modelo experimental, los efectos de la ES sobre las neuronas colinérgicas del NBM. Una segunda línea de actuación, podría llevar a añadir a nuestro modelo la estimulación simultánea de las NBM. Si nuestra hipótesis es correcta, la estimulación emparejada sobre la corteza, desde la periferia y desde el NBM, debería llevar a una normalización más rápida de los niveles colinérgicos en la corteza desaferentizada.



**Fig. 20.** Ciclo para las tecnologías emergentes. Informe Gartner 2013. Tomado de <http://www.gartner.com/technology/research/hype-cycles/>

## **4. POSIBLES IMPLICACIONES DE NUESTRO ESTUDIO**

### **4.1. APLICABILIDAD EN OTRAS PATOLOGÍAS. NEURORREPARACIÓN**

Tras determinadas lesiones cerebrales, como tras un accidente cerebro-vascular, algunos de los circuitos que transmiten información sensorial al cerebro sobreviven a la lesión. A la vista de nuestros resultados, donde la ES periférica protege a la corteza de los cambios degenerativos inducidos por la desaferentización, una activación de la vía sensorial aferente podría preservar los circuitos o regiones no lesionadas e, incluso, activar mecanismos de plasticidad hebbiana y homeostática que lleven a crear circuitos compensatorios (revisado extensamente en Gonzalez Andino et al., 2011); artículo aportado en la sección Anexos).

### **4.2. IMPLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE BMIs AVANZADAS**

Nuestros resultados muestran que las entradas periféricas provenientes de un sistema neuroprotésico tienen efectos de *normalización* anatomofuncional de la vía sensorial desaferentizada. Tanto los datos morfológicos como electrofisiológicos muestran que la estimulación artificial aplicada al nervio periférico conserva las propiedades anatómicas y funcionales de las regiones corticales, previniendo la disminución de la actividad metabólica, la pérdida de funcionamiento de las interneuronas inhibitorias y la reducción de volumen del tejido neural, subsiguientes a la amputación. Esto sugiere que, además de restaurar las capacidades sensoriales, las futuras neuroprótesis avanzadas podrían ser diseñadas para limitar los fenómenos de plasticidad maladaptativa y/o promover los fenómenos de plasticidad adaptativa.

Los científicos que trabajan en el desarrollo de nuevas interfaces han focalizado sus esfuerzos sobre temas específicos, como la respuesta inflamatoria neural, las características químicas y estructurales del material implantado o la estabilidad temporal del implante (del Valle and Navarro, 2013). Más allá de este conocimiento, creemos fundamental comprender el SNC y su reorganización tras la amputación para modelizar y predecir adecuadamente todos los fenómenos complejos que podrían dispararse por la implantación de neuroprótesis y de distintos tipos de BMIs. Aún se necesitan futuros estudios para demostrar si i) el nivel de reorganización en el SNC puede ser usado como parámetro de la efectividad conseguida por la neuroprótesis en restaurar la funcionalidad del miembro perdido, ii) el sistema neuroprotésico podría ser usado como

una herramienta para la neurorrehabilitación, puesto que induce una reducción de la plasticidad aberrante y promueve una “buena” plasticidad, y iii) nuevas generaciones de BMI podrían ser desarrolladas para explotar el fenómeno neuroplástico tanto en patología, como herramientas de neuroprotección/neurorreparación de las conexiones neurales.

Además, y debido a las implicaciones tanto en los procesos cognitivos como en la neuroplasticidad, el circuito colinérgico podría representar la principal diana para las futuras terapias de neuroprotección-neurorrehabilitación. A la vista de nuestros resultados, hipotetizamos que, para ser efectivas, las intervenciones terapéuticas basadas en sistemas BMIs, deberían necesariamente incorporar significado contextual o cognitivo, capaz de activar el sistema colinérgico. Esto podría llevar a la definición de nuevos protocolos de estimulación (como en el tratamiento por neuroestimulación del ACV o tras lesión cerebral traumática) basados en la implicación del sistema colinérgico, y al diseño de neuroprótesis sensoriales para que codifiquen y transmitan la información al SNC de forma que ésta sea completamente integrada en los circuitos secundarios.

Además de ser un tema científico apasionante, la actualidad es máxima. El prestigioso *Informe Gartner 2013*, (resultado de intensos estudios de mercado, innovación e impacto social, con un alto éxito en el cumplimiento de sus perspectivas a largo plazo) muestra que las BMIs son una de las tecnologías emergentes con mayor impacto para los próximos años y que, actualmente, sólo nos encontramos al inicio de pendiente de subida (Fig. 20).

## **VI. CONCLUSIONES**

---

---



## CONCLUSIONES

---

1. La estimulación artificial crónica del nervio infraorbitario amputado previene los cambios anatomofuncionales de la corteza de *barriles* desaferentizada inducidos por la desaferentización.
2. En concreto, la estimulación neuroprotésica mantiene la actividad metabólica, el volumen de neuropilo y las poblaciones de interneuronas inhibitorias Parvalbúmina- y Calbindina-positivas de las capas II/III y IV, así como la actividad electrofisiológica de la corteza de *barriles* desaferentizada, disminuidos tras amputación, en niveles próximos a la normalidad. Esto sugiere que la estimulación neuroprotésica es capaz de activar la vía aferente lesionada, y provocar despolarizaciones funcionales en las neuronas corticales que se traducen en una normalización de la organización estructural, de los circuitos inhibitorios intracorticales y de los niveles de excitabilidad y sincronización de la actividad cortical.
3. Los efectos de la estimulación neuroprotésica sobre la actividad metabólica, volumen y población de interneuronas inhibitorias son más prominentes en la capa IV que en las capas II/III de la corteza de *barriles* desaferentizada.
4. La innervación colinérgica cortical, disminuida tras la desaferentización periférica, no es susceptible de la acción neuroprotectora de la estimulación artificial, sugiriendo que su regulación no depende directamente de la actividad entrante.
5. El volumen de las estructuras subcorticales de la vía aferente, núcleo principal del trigémino y núcleo talámico ventroposterior medial, se ve afectado por las manipulaciones de las entradas periféricas. Los cambios en el volumen de las estructuras subcorticales, inducidos por la amputación y estimulación artificial, son de signo y magnitud muy similar a los detectados en la corteza, respectivamente. Esto sugiere que las estructuras subcorticales participan activamente en los eventos detectados en la corteza de *barriles* desaferentizada.
6. El conjunto de los resultados muestra que los estímulos artificiales aplicados, a través de una neuroprótesis, a un nervio periférico seccionado son capaces de activar la vía desaferentizada y de integrarse en los circuitos corticales, siguiendo la organización columnar, previniendo las consecuencias anatomofuncionales atróficas que siguen a la amputación.





## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



- Aldskogius, H., Arvidsson, J., 1978. Nerve cell degeneration and death in the trigeminal ganglion of the adult rat following peripheral nerve transection. *Journal of Neurocytology*. 7, 229-250.
- Aldskogius, H., Arvidsson, J., Grant, G., 1985. The reaction of primary sensory neurons to peripheral nerve injury with particular emphasis on transganglionic changes. *Brain Res.* 357, 27-46.
- Archibald, S.J., et al., 1991. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J.Comp Neurol.* 306, 685-696.
- Armstrong, D.M., et al., 1983. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol.* 216, 53-68.
- Armstrong-James, M., Fox, K., Das-Gupta, A., 1992. Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol.* 68, 1345-58.
- Avendano, C., et al., 1995. Decrease and long-term recovery of choline acetyltransferase immunoreactivity in adult cat somatosensory cortex after peripheral nerve transections. *J Comp Neurol.* 354, 321-32.
- Avendano, C., et al., 1996. Acetylcholine innervation of sensory and motor neocortical areas in adult cat: a choline acetyltransferase immunohistochemical study. *J.Chem.Neuroanat.* 11, 113-130.
- Avendano, C., et al., 2005. Neuron numbers in the sensory trigeminal nuclei of the rat: A. *J.Comp Neurol.* 493, 538-553.
- Barbaresi, P., et al., 1986. GABAergic neurons are present in the dorsal column nuclei but not in the ventroposterior complex of rats. *Brain Res.* 382, 305-26.
- Barth, A.L., et al., 2000. Upregulation of cAMP response element-mediated gene expression during experience-dependent plasticity in adult neocortex. *J Neurosci.* 20, 4206-16.
- Bates, C.A., Killackey, H.P., 1985. The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J Comp Neurol.* 240, 265-87.
- Bedard, C., Destexhe, A., 2009. Macroscopic models of local field potentials and the apparent 1/f noise in brain activity. *Biophys J.* 96, 2589-603.
- Belford, G.R., Killackey, H.P., 1979. Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol.* 183, 305-21.
- Bermejo, P.E., et al., 2003. Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J.Comp Neurol.* 463, 419-433.
- Bloem, B., Poorthuis, R.B., Mansvelder, H.D., 2014. Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Front Neural Circuits.* 8, 17.
- Bosman, L.W., et al., 2011. Anatomical pathways involved in generating and sensing rhythmic whisker movements. *Front Integr Neurosci.* 5, 53.
- Bourbeau, D.J., et al., 2011. A computational model for estimating recruitment of primary afferent fibers by intraneural stimulation in the dorsal root ganglia. *J Neural Eng.* 8, 056009.
- Brecht, M., Roth, A., Sakmann, B., 2003. Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol.* 553, 243-65.
- Bruchey, A.K., Gonzalez-Lima, F., 2008. Enhanced metabolic capacity of the frontal cerebral cortex after Pavlovian conditioning. *Neuroscience.* 152, 299-307.
- Buonomano, D.V., Merzenich, M.M., 1998. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci.* 21, 149-86.
- Burke, R.E., Kenyon, N., 1991. The effect of neonatal hypoxia-ischemia on striatal cholinergic neuropil: a quantitative morphologic analysis. *Exp Neurol.* 113, 63-73.
- Cajal, S.R., de Castro y Pascual, F., 1933. Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso, Vol., Tipografía Artística.
- Calford, M.B., 2002. Dynamic representational plasticity in sensory cortex. *Neuroscience.* 111, 709-738.

- Carder, R.K., Leclerc, S.S., Hendry, S.H., 1996. Regulation of calcium-binding protein immunoreactivity in GABA neurons of macaque primary visual cortex. *Cerebral Cortex*. 6, 271-287.
- Carmichael, S.T., Chesselet, M.F., 2002. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci*. 22, 6062-70.
- Carrozza, M.C., et al., 2006. Design of a cybernetic hand for perception and action. *Biol Cybern*. 95, 629-44.
- Carvell, G.E., Simons, D.J., 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *Journal of Neuroscience*. 10, 2638-2648.
- Celio, M.R., 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 35, 375-475.
- Chapin, J.K., Lin, C.S., 1984. Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *J Comp Neurol*. 229, 199-213.
- Chiaia, N.L., et al., 1992. Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary afferent neurons. *J Neurosci*. 12, 62-76.
- Chipchase, L.S., Schabrun, S.M., Hodges, P.W., 2011. Peripheral electrical stimulation to induce cortical plasticity: a systematic review of stimulus parameters. *Clin Neurophysiol*. 122, 456-63.
- Churchill, J.D., et al., 2004. Morphological correlates of injury-induced reorganization in primate somatosensory cortex. *BMC Neurosci*. 5, 43.
- Conner, J.M., et al., 2003. Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron*. 38, 819-29.
- Conner, J.M., Kulczycki, M., Tuszynski, M.H., 2010. Unique contributions of distinct cholinergic projections to motor cortical plasticity and learning. *Cerebral Cortex*. 20, 2739-2748.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 25, 295-301.
- Cramer, S.C., et al., 2011. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*. 134, 1591-609.
- Crissman, R.S., et al., 1991. Numbers of axons innervating mystacial vibrissa follicles in newborn and adult rats. *Somatosens Mot Res*. 8, 103-9.
- Cruikshank, S.J., Weinberger, N.M., 1996. Evidence for the Hebbian hypothesis in experience-dependent physiological plasticity of neocortex: a critical review. *Brain Res Brain Res Rev*. 22, 191-228.
- Cruz-Orive, L.M., 1999. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. *J Microsc*. 193, 182-98.
- Cusick, C.G., 1991. Nerve injury-induced depletion of tachykinin immunoreactivity in the somatosensory cortex of adult squirrel monkeys. *Brain Res*. 568, 314-8.
- DeFelipe, J., Hendry, S.H., Jones, E.G., 1989a. Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86, 2093-7.
- DeFelipe, J., Hendry, S.H., Jones, E.G., 1989b. Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain Res*. 503, 49-54.
- DeFelipe, J., et al., 1990. A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience*. 37, 655-73.
- DeFelipe, J., Farinas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol*. 39, 563-607.
- DeFelipe, J., 1993. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex*. 3, 273-89.
- DeFelipe, J., 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat*. 14, 1-19.

- DeFelipe, J., 2006. Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nat Rev Neurosci.* 7, 811-7.
- del Valle, J., Navarro, X., 2013. Interfaces with the peripheral nerve for the control of neuroprostheses. *Int Rev Neurobiol.* 109, 63-83.
- Desai, N.S., 2003. Homeostatic plasticity in the CNS: synaptic and intrinsic forms. *J Physiol Paris.* 97, 391-402.
- Desgent, S., Boire, D., Ptito, M., 2010. Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience.* 171, 1326-1340.
- Dhar, S.S., Wong-Riley, M.T., 2009. Coupling of energy metabolism and synaptic transmission at the transcriptional level: role of nuclear respiratory factor 1 in regulating both cytochrome c oxidase and NMDA glutamate receptor subunit genes. *Journal of Neuroscience.* 29, 483-492.
- Di Pino, G., Guglielmelli, E., Rossini, P.M., 2009. Neuroplasticity in amputees: main implications on bidirectional interfacing of cybernetic hand prostheses. *Progress in Neurobiology.* 88, 114-126.
- Duffau, H., 2006. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. *J Clin Neurosci.* 13, 885-97.
- Durham, D., Matschinsky, F.M., Rubel, E.W., 1993. Altered malate dehydrogenase activity in nucleus magnocellularis of the chicken following cochlea removal. *Hearing Research.* 70, 151-159.
- Eckenstein, F.P., Baughman, R.W., Quinn, J., 1988. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience.* 25, 457-74.
- Erzurumlu, R.S., Kind, P.C., 2001. Neural activity: sculptor of 'barrels' in the neocortex. *Trends Neurosci.* 24, 589-95.
- Erzurumlu, R.S., Gaspar, P., 2012. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 35, 1540-53.
- Fallon, J.B., Irvine, D.R.F., Shepherd, R.K., 2008. Cochlear implants and brain plasticity. *Hearing Research.* 238, 110-117.
- Farahvar, A., et al., 2007. Marked recovery of functional metabolic activity and laminar volumes in the rat hippocampus and dentate gyrus following postnatal hypothyroid growth retardation: a quantitative cytochrome oxidase study. *Experimental Neurology.* 204, 556-568.
- Ferdowsian, H.R., Beck, N., 2011. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PLoS One.* 6, e24059.
- Fettiplace, R., Hackney, C.M., 2006. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci.* 7, 19-29.
- Fischer, T.M., et al., 1997. Metaplasticity at identified inhibitory synapses in *Aplysia*. *Nature.* 389, 860-5.
- Floel, A., Cohen, L.G., 2010. Recovery of function in humans: cortical stimulation and pharmacological treatments after stroke. *Neurobiol Dis.* 37, 243-51.
- Flor, H., et al., 2001. Effect of sensory discrimination training on cortical reorganisation and phantom limb pain. *Lancet.* 357, 1763-4.
- Fox, K., 2002. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience.* 111, 799-814.
- Fox, K., Wong, R.O., 2005. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron.* 48, 465-77.
- Frenkel, M.Y., Bear, M.F., 2004. How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice. *Neuron.* 44, 917-23.
- Froemke, R.C., et al., 2013. Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nat Neurosci.* 16, 79-88.
- Frohlich, F., McCormick, D.A., 2010. Endogenous electric fields may guide neocortical network activity. *Neuron.* 67, 129-43.
- Fundin, B.T., et al., 1994. The innervation of the mystacial pad in the adult rat studied by anterograde transport of HRP conjugates. *Exp Brain Res.* 99, 233-46.

- Fundin, B.T., Arvidsson, J., Rice, F.L., 1995. Innervation of nonmystacial vibrissae in the adult rat. *J Comp Neurol.* 357, 501-12.
- Furey, M.L., 2011. The prominent role of stimulus processing: cholinergic function and dysfunction in cognition. *Curr Opin Neurol.* 24, 364-70.
- Garde, K., et al., 2009. Early interfaced neural activity from chronic amputated nerves. *Front Neuroeng.* 2, 5.
- Garraghty, P.E., Kaas, J.H., 1991. Functional reorganization in adult monkey thalamus after peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 2, 747-750.
- Garraghty, P.E., LaChica, E.A., Kaas, J.H., 1991. Injury-induced reorganization of somatosensory cortex is accompanied by reductions in GABA staining. *Somatosensory and Motor Research.* 8, 347-354.
- Garraghty, P.E., Muja, N., 1996. NMDA receptors and plasticity in adult primate somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 367, 319-26.
- Gierdalski, M., et al., 1999. Deafferentation induced changes in GAD67 and GluR2 mRNA expression in mouse somatosensory cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* 71, 111-9.
- Gil, Z., Connors, B.W., Amitai, Y., 1997. Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron.* 19, 679-86.
- Gilbert, C.D., Li, W., 2012. Adult visual cortical plasticity. *Neuron.* 75, 250-64.
- Goard, M., Dan, Y., 2009. Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nat Neurosci.* 12, 1444-9.
- Golaszewski, S.M., et al., 2004. Modulatory effects on human sensorimotor cortex by whole-hand afferent electrical stimulation. *Neurology.* 62, 2262-9.
- Golden, J.P., et al., 1997. Development of terminals and synapses in laminae I and II of the rat medullary dorsal horn after infraorbital nerve transection at birth. *J Comp Neurol.* 383, 339-48.
- Golmayo, L., Nunez, A., Zaborszky, L., 2003. Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neuroscience.* 119, 597-609.
- Gonchar, Y., Burkhalter, A., 1997. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral Cortex.* 7, 347-358.
- Gonzalez Andino, S.L., et al., 2011. Combining BMI Stimulation and Mathematical Modeling for Acute Stroke Recovery and Neural Repair. *Front Neurosci.* 5, 87.
- Gould, E., Gross, C.G., 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci.* 22, 619-23.
- Gross, C.G., 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci.* 1, 67-73.
- Gulyas, A.I., et al., 2006. Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *European Journal of Neuroscience.* 23, 2581-2594.
- Gundersen, H.J., et al., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96, 857-881.
- Haidarliu, S., et al., 2008. Lemniscal and Extralemniscal Compartments in the VPM of the Rat. *Front Neuroanat.* 2, 4.
- Hardie, N.A., 1998. The consequences of deafness and chronic intracochlear electrical stimulation on the central auditory pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25, 303-9.
- Hardie, N.A., Shepherd, R.K., 1999. Sensorineural hearing loss during development: morphological and physiological response of the cochlea and auditory brainstem. *Hear Res.* 128, 147-65.
- Hasselmo, M.E., Sarter, M., 2011. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology.* 36, 52-73.
- Hebb, D.O., 1950. Organization of behavior. New York: Wiley, 1949, pp. 335. *Journal of Clinical Psychology.* 6, 307-307.
- Hensch, T.K., 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci.* 6, 877-88.

- Hevner, R.F., Wong-Riley, M.T., 1989. Brain cytochrome oxidase: purification, antibody production, and immunohistochemical/histochemical correlations in the CNS. *Journal of Neuroscience*. 9, 3884-3898.
- Hevner, R.F., Liu, S., Wong-Riley, M.T., 1995. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience*. 65, 313-342.
- Holmes, G.L., McCabe, B., 2001. Brain development and generation of brain pathologies. *Int Rev Neurobiol*. 45, 17-41.
- Howard, V., Reed, M.G., 1998. *Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy*, Vol., Bios.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*. 160, 106-54.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol*. 206, 419-36.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., LeVay, S., 1977. Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 278, 377-409.
- Irle, E., Markowitsch, H.J., 1986. Afferent connections of the substantia innominata/basal nucleus of Meynert in carnivores and primates. *J Hirnforsch*. 27, 343-67.
- Irvine, D.R., Fallon, J.B., Kamke, M.R., 2006. Plasticity in the Adult Central Auditory System. *Acoust Aust*. 34, 13-17.
- Irving, S., et al., 2013. Cochlear implantation for chronic electrical stimulation in the mouse. *Hearing Research*. 306, 37-45.
- Jackson, M.E., Cauller, L.J., 1998. Neural activity in SII modifies sensory evoked potentials in SI in awake rats. *Neuroreport*. 9, 3379-82.
- Jacobs, K.M., Donoghue, J.P., 1991. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science*. 251, 944-7.
- Jacquin, M.F., Golden, J., Panneton, W.M., 1988. Structure and function of barrel 'precursor' cells in trigeminal nucleus principalis. *Brain Res*. 471, 309-14.
- Jacquin, M.F., et al., 1990. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosens Mot Res*. 7, 399-420.
- Jain, N., Florence, S.L., Kaas, J.H., 1998. Reorganization of Somatosensory Cortex After Nerve and Spinal Cord Injury. *News Physiol Sci*. 13, 143-149.
- Jiao, Y., et al., 2006. Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits. *Journal of Neuroscience*. 26, 8691-8701.
- Jones, E.G., 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex*. 3, 361-72.
- Jones, E.G., 2000. Cortical and subcortical contributions to activity-dependent plasticity in primate somatosensory cortex. *Annu Rev Neurosci*. 23, 1-37.
- Jones, J.P., Nicholas, H.J., Ramsey, R.B., 1975. Rate of sterol formation by rat brain glia and neurons in vitro and in vivo. *J Neurochem*. 24, 123-6.
- Kaas, J.H., Merzenich, M.M., Killackey, H.P., 1983. The reorganization of somatosensory cortex following peripheral nerve damage in adult and developing mammals. *Annual Review of Neuroscience*. 6, 325-356.
- Kaas, J.H., 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci*. 14, 137-67.
- Kaas, J.H., Florence, S.L., Jain, N., 1999. Subcortical contributions to massive cortical reorganizations. *Neuron*. 22, 657-60.
- Kaelin-Lang, A., et al., 2002. Modulation of human corticomotor excitability by somatosensory input. *J Physiol*. 540, 623-33.
- Kai-Kai, M.A., 1989. Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 93, 183-93.
- Kamke, M.R., Brown, M., Irvine, D.R., 2003. Plasticity in the tonotopic organization of the medial geniculate body in adult cats following restricted unilateral cochlear lesions. *J.Comp Neurol*. 459, 355-367.



- Karl, A., et al., 2004. Neuroelectric source imaging of steady-state movement-related cortical potentials in human upper extremity amputees with and without phantom limb pain. *Pain*. 110, 90-102.
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex*. 7, 476-86.
- Kilgard, M.P., Merzenich, M.M., 1998. Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science*. 279, 1714-8.
- Kis, Z., et al., 1999. Comparative study of the neuronal plasticity along the neuraxis of the vibrissal sensory system of adult rat following unilateral infraorbital nerve damage and subsequent regeneration. *Experimental Brain Research*. 126, 259-269.
- Klinke, R., et al., 1999. Recruitment of the auditory cortex in congenitally deaf cats by long-term cochlear electrostimulation. *Science*. 285, 1729-1733.
- Kossut, M., et al., 1988. Single vibrissal cortical column in SI cortex of rat and its alterations in neonatal and adult vibrissa-deafferented animals: a quantitative 2DG study. *J Neurophysiol*. 60, 829-52.
- Kossut, M., 1992a. Plasticity of the barrel cortex neurons. *Prog Neurobiol*. 39, 389-422.
- Kossut, M., 1992b. Effects of sensory deprivation upon a single cortical vibrissal column: a 2DG study. *Exp Brain Res*. 90, 639-42.
- Kossut, M., Juliano, S.L., 1999. Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissotomy in the barrel cortex of adult mice. *Neuroscience*. 92, 807-17.
- Kublik, E., Musial, P., Wrobel, A., 2001. Identification of principal components in cortical evoked potentials by brief surface cooling. *Clin Neurophysiol*. 112, 1720-5.
- Kublik, E., 2004. Contextual impact on sensory processing at the barrel cortex of awake rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 64, 229-38.
- Kuhar, M., Yamamura, H.I., 1976. Localization of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by light microscopic radioautography. *Brain Res*. 110, 229-43.
- Lagares, A., Avendano, C., 2000. Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat. *Brain Res*. 865, 202-10.
- LaManna, J.C., et al., 1996. Decreased energy metabolism in brain stem during central respiratory depression in response to hypoxia. *J.Appl.Physiol*. 81, 1772-1777.
- Land, P.W., Buffer, S.A., Jr., Yaskosky, J.D., 1995. Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J.Comp Neurol*. 355, 573-588.
- Land, P.W., Erickson, S.L., 2005. Subbarrel domains in rat somatosensory (S1) cortex. *J Comp Neurol*. 490, 414-26.
- Lehmann, J., et al., 1980. The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience*. 5, 1161-74.
- Lemann, W., Saper, C.B., 1985. Evidence for a cortical projection to the magnocellular basal nucleus in the rat: an electron microscopic axonal transport study. *Brain Res*. 334, 339-43.
- Liu, C.N., Chambers, W.W., 1958. Intrasprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 79, 46-61.
- Lotze, M., et al., 1999. Does use of a myoelectric prosthesis prevent cortical reorganization and phantom limb pain? *Nat Neurosci*. 2, 501-2.
- Ma, P.M., 1991. The barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol*. 309, 161-99.
- Ma, T., et al., 2001. A quantitative histochemistry technique for measuring regional distribution of acetylcholinesterase in the brain using digital scanning densitometry. *Anal Biochem*. 296, 18-28.
- Machin, R., et al., 2004. The size of the whisker barrel field in adult rats: minimal nondirectional asymmetry and limited modifiability by chronic changes of the sensory input. *Brain Research*. 1025, 130-138.

- Machin, R., et al., 2006. Effects of long-term sensory deprivation on asymmetric synapses in the whisker barrel field of the adult rat. *Brain Research*. 1107, 104-110.
- Magavi, S.S., Macklis, J.D., 2002. Induction of neuronal type-specific neurogenesis in the cerebral cortex of adult mice: manipulation of neural precursors in situ. *Brain Res Dev Brain Res*. 134, 57-76.
- Maier, D.L., et al., 2003. Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters. *Experimental Neurology*. 184, 737-745.
- Malenka, R.C., Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 44, 5-21.
- Martin, Y.B., et al., 2014. Trigeminal intersubnuclear neurons: Morphometry and input-dependent structural plasticity in adult rats. *J Comp Neurol*. 522, 1597-617.
- Masliyah, E., et al., 1990. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem*. 38, 837-44.
- Mataga, N., Mizuguchi, Y., Hensch, T.K., 2004. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*. 44, 1031-41.
- Matsushima, J.I., et al., 1991. Electrical stimulation of the auditory nerve in deaf kittens: effects on cochlear nucleus morphology. *Hearing Research*. 56, 133-142.
- McClung, C.A., Nestler, E.J., 2008. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*. 33, 3-17.
- Merabet, L.B., Pascual-Leone, A., 2010. Neural reorganization following sensory loss: the opportunity of change. *Nat Rev Neurosci*. 11, 44-52.
- Merzenich, M.M., et al., 1983a. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*. 8, 33-55.
- Merzenich, M.M., et al., 1983b. Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience*. 10, 639-65.
- Mesulam, M.M., et al., 1983a. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 214, 170-97.
- Mesulam, M.M., et al., 1983b. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 10, 1185-201.
- Metherate, R., Weinberger, N.M., 1989. Acetylcholine produces stimulus-specific receptive field alterations in cat auditory cortex. *Brain Res*. 480, 372-7.
- Metherate, R., Ashe, J.H., 1993. Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex. *Synapse*. 14, 132-43.
- Micera, S., Navarro, X., 2009. Bidirectional interfaces with the peripheral nervous system. *International Review of Neurobiology*. 86, 23-38.
- Miller, A.L., et al., 2003. Mechanism of electrical stimulation-induced neuroprotection: effects of verapamil on protection of primary auditory afferents. *Brain Research*. 966, 218-230.
- Mowery, T.M., Elliott, K.S., Garraghty, P.E., 2009. The cortical response to sensory deprivation in adult rats is affected by gonadectomy. *Experimental Brain Research*. 195, 27-33.
- Munoz, W., Rudy, B., 2014. Spatiotemporal specificity in cholinergic control of neocortical function. *Curr Opin Neurobiol*. 26c, 149-160.
- Myers, W.A., et al., 2000. Role of NMDA receptors in adult primate cortical somatosensory plasticity. *J Comp Neurol*. 418, 373-82.
- Negredo, P., et al., 2009. Trigeminothalamic barrelette neurons: natural structural side asymmetries and sensory input-dependent plasticity in adult rats. *Neuroscience*. 163, 1242-1254.
- Nguyen, D.K., Botez, M.I., 1998. Diaschisis and neurobehavior. *Can J Neurol Sci*. 25, 5-12.
- Nordeen, K.W., Killackey, H.P., Kitzes, L.M., 1983. Ascending Projections to the Inferior Colliculus Following Unilateral Cochlear Ablation in the Neonatal Gerbil, *Meriones-Unguiculatus*. *Journal of Comparative Neurology*. 214, 144-153.
- Nowicka, D., et al., 2009. Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur J Neurosci*. 30, 2053-63.

- Otte, J., Schunknecht, H.F., Kerr, A.G., 1978. Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *Laryngoscope*. 88, 1231-1246.
- Panetsos, F., Nunez, A., Avendano, C., 1995. Local anaesthesia induces immediate receptive field changes in nucleus gracilis and cortex. *Neuroreport*. 7, 150-2.
- Panetsos, F., Nunez, A., Avendano, C., 1997. Electrophysiological effects of temporary deafferentation on two characterized cell types in the nucleus gracilis of the rat. *Eur J Neurosci*. 9, 563-72.
- Panetsos, F., et al., 2008. Neural prostheses: electrophysiological and histological evaluation of central nervous system alterations due to long-term implants of sieve electrodes to peripheral nerves in cats. *IEEE Trans.Neural Syst.Rehabil.Eng.* 16, 223-232.
- Papa, M., et al., 2014. Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci Biobehav Rev*. 42c, 35-54.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Vol. Fourth Edition, Academic Press, San Diego, California, USA.
- Petersen, C.C., Sakmann, B., 2000. The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci*. 20, 7579-86.
- Petersen, C.C., 2007. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*. 56, 339-55.
- Pettit, M.J., Schwark, H.D., 1993. Receptive field reorganization in dorsal column nuclei during temporary denervation. *Science*. 262, 2054-6.
- Phillis, J.W., 2005. Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Crit Rev Neurobiol*. 17, 161-217.
- Pierret, T., Lavallee, P., Deschenes, M., 2000. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J Neurosci*. 20, 7455-62.
- Porter, J.T., Johnson, C.K., Agmon, A., 2001. Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*. 21, 2699-710.
- Posteraro, F., et al., 2010. Upper limb spasticity reduction following active training: a robot-mediated study in patients with chronic hemiparesis. *J Rehabil Med*. 42, 279-81.
- Powell, T.P., Erulkar, S.D., 1962. Transneuronal cell degeneration in the auditory relay nuclei of the cat. *Journal of Anatomy*. 96, 249-268.
- Ramanathan, D., Tuszyński, M.H., Conner, J.M., 2009. The basal forebrain cholinergic system is required specifically for behaviorally mediated cortical map plasticity. *Journal of Neuroscience*. 29, 5992-6000.
- Rasmusson, D.D., 2000. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav.Brain Res*. 115, 205-218.
- Raspopovic, S., et al., 2014. Restoring natural sensory feedback in real-time bidirectional hand prostheses. *Sci Transl Med*. 6, 222ra19.
- Rasskazoff, S.Y., Slavin, K.V., 2012. An update on peripheral nerve stimulation. *J Neurosurg Sci*. 56, 279-85.
- Rausell, E., et al., 1992. Chronic deafferentation in monkeys differentially affects nociceptive and nonnociceptive pathways distinguished by specific calcium-binding proteins and down-regulates gamma-aminobutyric acid type A receptors at thalamic levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 2571-5.
- Ridding, M.C., et al., 2001. Changes in corticomotor representations induced by prolonged peripheral nerve stimulation in humans. *Clin Neurophysiol*. 112, 1461-9.
- Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., Donoghue, J.P., 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science*. 290, 533-6.
- Rosier, A.M., et al., 1995. Effect of sensory deafferentation on immunoreactivity of GABAergic cells and on GABA receptors in the adult cat visual cortex. *J Comp Neurol*. 359, 476-89.
- Rossini, P.M., Dal Forno, G., 2004. Integrated technology for evaluation of brain function and neural plasticity. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 15, 263-306.
- Rothe, T., et al., 1990. Changes in choline acetyltransferase activity and high-affinity choline uptake, but not in acetylcholinesterase activity and muscarinic cholinergic receptors, in rat somatosensory cortex after sciatic nerve injury. *Somatosens Mot Res*. 7, 435-46.

- Ruiz-Marcos, A., Valverde, F., 1969. The temporal evolution of the distribution of dendritic spines in the visual cortex of normal and dark raised mice. *Exp Brain Res.* 8, 284-94.
- Ruiz-Marcos, A., Valverde, F., 1970. Dynamic architecture of the visual cortex. *Brain Res.* 19, 25-39.
- Russell, W.M.S.B.R.L., 1959. The principles of humane experimental technique. Vol., ed.^eds. Methuen, London.
- Sarter, M., et al., 2014. Deterministic functions of cortical acetylcholine. *Eur J Neurosci.*
- Sawtell, N.B., et al., 2003. NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex. *Neuron.* 38, 977-85.
- Schwartz, D.R., et al., 1993. Chronic electrical stimulation reverses deafness-related depression of electrically evoked 2-deoxyglucose activity in the guinea pig inferior colliculus. *Hearing Research.* 70, 243-249.
- Sejnowski, T.J., 1999. The book of Hebb. *Neuron.* 24, 773-6.
- Semba, K., 2000. Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav.Brain Res.* 115, 117-141.
- Sharma, A., Nash, A.A., Dorman, M., 2009. Cortical development, plasticity and re-organization in children with cochlear implants. *J Commun Disord.* 42, 272-9.
- Shepherd, R.K., et al., 1997. The central auditory system and auditory deprivation: Experience with cochlear implants in the congenitally deaf. *Acta Oto-Laryngologica.* 28-33.
- Shepherd, R.K., Hardie, N.A., 2001. Deafness-induced changes in the auditory pathway: Implications for cochlear implants. *Audiology and Neuro-Otology.* 6, 305-318.
- Shepherd, R.K., Coco, A., Epp, S.B., 2008. Neurotrophins and electrical stimulation for protection and repair of spiral ganglion neurons following sensorineural hearing loss. *Hearing Research.* 242, 100-109.
- Sillito, A.M., Kemp, J.A., 1983. Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain Res.* 289, 143-55.
- Simons, D.J., Woolsey, T.A., 1979. Functional organization in mouse barrel cortex. *Brain Res.* 165, 327-32.
- Siucinska, E., Kossut, M., 1994. Short term changes of cortical body maps following partial vibrissotomy in adult mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 54, 345-54.
- Skibinska, A., et al., 2000. Age-dependent response of the mouse barrel cortex to sensory deprivation: a 2-deoxyglucose study. *Experimental Brain Research.* 132, 134-138.
- St Peters, M., et al., 2011. Enhanced control of attention by stimulating mesolimbic-cortical cholinergic circuitry. *J Neurosci.* 31, 9760-71.
- Sun, Q.Q., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 2006. Barrel cortex microcircuits: thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons. *J Neurosci.* 26, 1219-30.
- Sutoo, D., et al., 1994. Quantitative analysis of immunohistochemical distributions of cholinergic and catecholaminergic systems in the human brain. *Neuroscience.* 58, 227-34.
- Tailby, C., et al., 2005. Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102, 4631-4636.
- Terayama, Y., et al., 1977. Ultrastructural changes of the nerve elements following disruption of the organ of Corti. I. Nerve elements in the organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 83, 291-302.
- Valla, J., Berndt, J.D., Gonzalez-Lima, F., 2001. Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *Journal of Neuroscience.* 21, 4923-4930.
- Valverde, F., Ruiz-Marcos, A., 1969. Dendritic spines in the visual cortex of the mouse: introduction to a mathematical model. *Exp Brain Res.* 8, 269-83.
- Van Der Loos, H., 1976. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett.* 2, 1-6.
- Veinante, P., Jacquin, M.F., Deschenes, M., 2000. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol.* 420, 233-43.

- Waite, P.M., 1984. Rearrangement of neuronal responses in the trigeminal system of the rat following peripheral nerve section. *J Physiol.* 352, 425-45.
- Waite, P.M.E., Tracey, D.J., 1995. Trigeminal sensory system. In: The rat nervous system. Vol., G. Paxinos, ed. Academic Press, San Diego, pp. 705-724.
- Wall, J.T., et al., 1986. Functional reorganization in somatosensory cortical areas 3b and 1 of adult monkeys after median nerve repair: possible relationships to sensory recovery in humans. *J Neurosci.* 6, 218-33.
- Wall, J.T., Xu, J., Wang, X., 2002. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. *Brain Research. Brain Research Reviews.* 39, 181-215.
- Wall, P.D., Egger, M.D., 1971. Formation of new connexions in adult rat brains after partial deafferentation. *Nature.* 232, 542-5.
- Wallace, H., Fox, K., 1999. The effect of vibrissa deprivation pattern on the form of plasticity induced in rat barrel cortex. *Somatosensory and Motor Research.* 16, 122-138.
- Wallace, W., Bear, M.F., 2004. A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. *J Neurosci.* 24, 6928-38.
- Weiss, T., et al., 1999. Decrease in phantom limb pain associated with prosthesis-induced increased use of an amputation stump in humans. *Neurosci Lett.* 272, 131-4.
- Welker, E., Soriano, E., Van der, L.H., 1989. Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity. *Experimental Brain Research.* 74, 441-452.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482-497.
- Whittingstall, K., Logothetis, N.K., 2009. Frequency-band coupling in surface EEG reflects spiking activity in monkey visual cortex. *Neuron.* 64, 281-9.
- Wiesel, T.N., Hubel, D.H., 1965. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol.* 28, 1029-40.
- Williams, S., Lacaille, J.C., 1992. GABAB receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation and by glutamate stimulation of interneurons in stratum lacunosum-moleculare in hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. *Synapse.* 11, 249-58.
- Wimmer, V.C., et al., 2010. Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissa cortex. *Cereb Cortex.* 20, 2265-76.
- Wolff, A., et al., 2011. 21. Phantom pain. *Pain Pract.* 11, 403-13.
- Wong-Riley, M., 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Research.* 171, 11-28.
- Wong-Riley, M.T., Merzenich, M.M., Leake, P.A., 1978. Changes in endogenous enzymatic reactivity to DAB induced by neuronal inactivity. *Brain Research.* 141, 185-192.
- Wong-Riley, M.T., Welt, C., 1980. Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissa removal in neonatal and adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 2333-7.
- Wong-Riley, M.T., et al., 1981. Maintenance of neuronal activity by electrical stimulation of unilaterally deafened cats demonstrable with cytochrome oxidase technique. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* 90, 30-32.
- Wong-Riley, M.T., 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences.* 12, 94-101.
- Woods, T.M., et al., 2000. Progressive transneuronal changes in the brainstem and thalamus after long-term dorsal rhizotomies in adult macaque monkeys. *J Neurosci.* 20, 3884-99.
- Woolsey, T.A., Van der, L.H., 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research.* 17, 205-242.

- Woolsey, T.A., Van der Loos, H., 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17, 205-42.
- Woolsey, T.A., Welker, C., Schwartz, R.H., 1975. Comparative anatomical studies of the SmL face cortex with special reference to the occurrence of "barrels" in layer IV. *J.Comp Neurol.* 164, 79-94.
- Wu, C.W., Seo, H.J., Cohen, L.G., 2006. Influence of electric somatosensory stimulation on paretic-hand function in chronic stroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 87, 351-7.
- Xiang, Z., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 1998. Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science.* 281, 985-8.
- Xu, J., Wall, J.T., 1997. Rapid changes in brainstem maps of adult primates after peripheral injury. *Brain Res.* 774, 211-5.
- Yang, S.J., Liang, H.L., Wong-Riley, M.T., 2006. Activity-dependent transcriptional regulation of nuclear respiratory factor-1 in cultured rat visual cortical neurons. *Neuroscience.* 141, 1181-1192.
- Yu, C., et al., 2006. Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. *PLoS Biol.* 4, e124.
- Zaborszky, L., Cullinan, W.E., Braun, A., 1991. Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: an update. *Adv Exp Med Biol.* 295, 43-100.
- Zaborszky, L., et al., 2013. Neurons in the Basal Forebrain Project to the Cortex in a Complex Topographic Organization that Reflects Corticocortical Connectivity Patterns: An Experimental Study Based on Retrograde Tracing and 3D Reconstruction. *Cereb Cortex.*
- Zhang, C., Wong-Riley, M.T., 2000. Depolarizing stimulation upregulates GA-binding protein in neurons: a transcription factor involved in the bigenomic expression of cytochrome oxidase subunits. *European Journal of Neuroscience.* 12, 1013-1023.



## **VIII. ANEXOS**

---





---

## ANEXOS

---

### 1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 1.1. **Herrera-Rincon, C.**, Torets, C., Sanchez-Jimenez, A., Avendaño, C., Guillen, P., Panetsos, F. 2010. Structural preservation of deafferented cortex induced by electrical stimulation of a sensory peripheral nerve. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010, 5066-5069.
- 1.2. Gonzalez Andino, S.L., **Herrera-Rincon, C.**, Panetsos, F., Grave de Peralta, R. 2011. Combining BMI Stimulation and Mathematical Modeling for Acute Stroke Recovery and Neural Repair. *Front Neurosci.* 5, 87.
- 1.3. **Herrera-Rincon, C.**, Torets, C., Sanchez-Jimenez, A., Avendaño, C., Panetsos, F. 2012. Chronic electrical stimulation of transected peripheral nerves preserves anatomy and function in the primary somatosensory cortex. *Eur J Neurosci.* 36, 3679-3690.

